

**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**

---

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CAMPUS TUXTEPEC

"Evaluación del efecto del medio de cultivo sobre la producción de pigmentos de *Beauveria bassiana* DS3.17 mediante fermentación líquida"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Ingeniera en Biotecnología

PRESENTA:

KEYLA NINIVE LÓPEZ LUÉVANO

Director: Dr. Oscar Núñez Gaona

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA 2021

## COPIA DE ACTA DE REVISIÓN DE TESIS



### UNIVERSIDAD DEL PAPAŁOAPAN CAMPUS TUXTEPEC


#### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

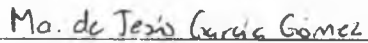
En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 22 de febrero de 2021 a las 17 hr, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada **"Evaluación del efecto del medio de cultivo sobre la producción de pigmentos de *Beauveria bassiana* DS3.17 mediante fermentación líquida"** presentada por la alumna **Keyla Ninive López Luévano**, con número de matrícula **14090566**, aspirante al título de Licenciatura.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que la aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.


Tuxtepec, Oaxaca, a 22 de febrero de 2019


ATENTAMENTE  
LA COMISIÓN REVISORA

  
Dr. Oscar Núñez Gaona  
Profesor Investigador  
Universidad del Papaloapan  
Director de Tesis

  
Dra. María de Jesús García Gómez  
Profesor Investigador  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
Dra. Alma Xochil Avila Alejandre  
Profesor Investigador  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
Dr. Adolfo López Torres  
Profesor Investigador  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
Dr. Enrique Villalobos Amador  
Profesor Investigador  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

# COPIA DE OFICIO DE AUTORIZACIÓN DE TESIS



## UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 26 de febrero de 2021  
Oficio No. JCIB/010/02/2021

**Lic. Yesenia Barrientos Arenal**  
Jefe de Servicios Escolares  
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna **Keyla Ninive López Luévano** titulado "**Evaluación del efecto del medio de cultivo sobre la producción de pigmentos de *Beauveria bassiana* DS3.17 mediante fermentación líquida**", para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

Presidente: Dra. María de Jesús García Gómez  
Secretario: Dra. Alma Xochil Avila Alejandre  
Vocal: Dr. Adolfo López Torres  
Primer Suplente: Dr. Enrique Villalobos Amador  
Segundo Suplente: Dr. Óscar Abelardo Ramírez Marroquín

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.



SECRETARÍA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA  
CAMPUS TUXTEPEC

**Dr. Julián Mario Peña Castro**  
Jefe de Carrera de Ingeniería en Biotecnología  
Universidad del Papaloapan

Atentamente  
*Terra uberrima, mens aperta*  
*Bou Lo-tama, chí jí jú*

**Vo.Bo. M.C. Hector López Arjona**  
Vice Rector Académico  
Universidad del Papaloapan



VICERECTORÍA ACADÉMICA

c.c.p. Dr. Óscar Núñez Gaona, Director de tesis, Para su conocimiento  
c.c.p. Keyla Ninive López Luévano, Alumno, Para su conocimiento  
c.c.p. Archivo

## HOJA DE ORIGINALIDAD

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

## **AGRADECIMIENTOS**

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado a la Universidad del Papaloapan a través de los proyectos de apoyo a la Infraestructura Científica INFRA-2015-01-252013 e INFRA-2019-301144.

Agradezco a mi comité revisor conformado por la Doctora Alma Xóchitl Ávila Alejandre, Doctora María de Jesús García Gómez, Doctor Adolfo López Torres y al Doctor Enrique Villalobos Amador.

A mis compañeros y amigos Jared, Mafer, Lore, Viviana, Aridaith por apoyarme con todas las recomendaciones posibles para escribir mi tesis, dándome ánimos y consejos. Max, Ivan, Alexis y Wendy, por hacer de este trayecto algo divertido, incluso en las etapas más complicadas de exámenes, prácticas y experimentos de tesis; siempre estuvieron presentes.

Al Doctor Oscar Núñez Gaona, porque se llevó la parte más difícil; por su paciencia y por enseñarme a resistir. Esa confianza depositada en mí se la voy agradecer siempre.

Al Doctor Adolfo López Torres, uno de los profesores más dedicados de la Universidad que me apoyó en todo momento, brindándome atención y tiempo para terminar mi último objetivo de tesis.

Al Doctor Aurelio Ramírez Hernández por su ayuda en la lectura de mis muestras.

Al Doctor Julián Mario Peña por el apoyo brindado a lo largo de mi licenciatura como jefe de Carrera del Instituto de Biotecnología.

A la Doctora Nelda Xanath Martínez Galero, por ser la primera profesora que me enseñó a trabajar en el laboratorio.

## DEDICATORIA

*Primero que nada, quiero dar gracias a Dios por permitirme llegar hasta este momento de mi vida*

### **A MI BELLA FAMILIA Y AMIGOS**

Todo el esfuerzo y amor que conllevó la realización de este trabajo va dedicado a las personas más importantes en mi vida, comenzando por:

Mi mamá Carmen Almodóvar (Q.E.P.D.) y a mi abuelito Antonio Luévano (Q.E.P.D.), por enseñarme a siempre luchar por mis sueños. A mi mamá Carmen Luévano, por todo el amor que me ha brindado. A mi tío Víctor Luévano que es también mi segundo padre, por estar siempre pendiente de mí, dándome valiosos consejos. Y a mis hermanas Brenda e Isol, por su cariño y comprensión.

Mis mejores amigos, que se han convertido en mi segunda familia: Mayeli Téllez, Irving Cruz y Emmanuel Ramírez, quienes a pesar de la distancia siempre me han acompañado en las buenas y en las malas, cuidándome en todo momento. Y finalmente, a Luis Fernando López, quien siempre estuvo dándome los ánimos para lograr subir este escalón.

## ÍNDICE

|   |      |
|---|------|
| ÍNDICE DE TABLAS.....   | VII  |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....  | VIII |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....                                     | X    |
| RESUMEN.....  | XII  |
| ABSTRACT .....  | XIII |
| 1. INTRODUCCIÓN .....   | 1    |
| 2. MARCO TEÓRICO .....  | 2    |
| 2.1 Control Biológico.....                                      | 2    |
| 2.2 Hongos Entomopatógenos.....                                 | 3    |
| 2.2.1 <i>Beauveria bassiana</i> .....                           | 4    |
| 2.2.1.1 Taxonomía .....   | 5    |
| 2.2.1.2 Morfología .....  | 6    |
| 2.2.1.3 Mecanismo de infección .....                            | 7    |
| 2.3 Metabolitos secundarios.....                                | 8    |
| 2.3.1 Micotoxinas .....   | 10   |
| 2.4 Fermentación líquida .....                                  | 13   |
| 2.5 Técnicas de identificación de metabolitos secundarios ..... | 15   |
| 3. ANTECEDENTES.....  | 16   |
| 3.1 Espectroscopía Infrarroja de pigmentos fúngicos .....       | 17   |
| 3.2 Espectrometría de masas.....                                | 19   |
| 4. JUSTIFICACIÓN .....  | 21   |
| 5. HIPÓTESIS.....   | 22   |

|  |    |
|--|----|
| 6. OBJETIVOS.....  | 23 |
| 6.1 Principal.....   | 23 |
| 6.2 Secundarios .....  | 23 |
| 7. MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 24 |
| 7.1 Estrategia experimental .....  | 24 |
| 7.2 Microorganismo .....   | 25 |
| 7.3 Condiciones de cultivo .....   | 25 |
| 7.3.1 Preparación de Inóculo .....   | 25 |
| 7.3.2 Fermentación Líquida.....  | 25 |
| 7.4 Producción aislamiento y caracterización parcial del pigmento .....                  | 26 |
| 7.4.1 Extracción en fase sólida .....  | 27 |
| 7.4.2 Obtención de extractos .....   | 27 |
| 7.4.3 Liofilización del concentrado.....   | 27 |
| 7.5 Identificación de metabolitos .....  | 28 |
| 7.5.1 Condiciones de operaciones de espectrómetro de masas .....                         | 28 |
| 7.5.2 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier.....                      | 28 |
| 7.6 Análisis estadístico .....   | 28 |
| 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....  | 29 |
| 8.1 Fermentación líquida .....   | 29 |
| 8.1.2 Producción de biomasa .....  | 33 |
| 8.1.3 Producción de conidios .....   | 36 |
| 8.1.4 Evolución del pH durante las fermentaciones .....                                  | 37 |
| 8.2 Identificación analítica del pigmento rojo de <i>Beauveria bassiana</i> DS3.17 ..... | 41 |
| 8.3 Análisis mediante espectrometría de masas del extracto obtenido .....                | 44 |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 8.4 Rendimiento del pigmento ..... | 47 |
| 9. CONCLUSIONES.....               | 48 |
| 10. PERSPECTIVAS.....              | 49 |
| 11. REFERENCIAS .....              | 50 |
| 12. TRABAJOS PRESENTADOS .....     | 63 |
| 13. ANEXO.....                     | 64 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Plagas controladas en cultivos de importancia agrícola por <i>Beauveria bassiana</i> (Pacheco-Hernández <i>et al.</i> , 2019). .....         | 5  |
| <b>Tabla 2.</b> Taxonomía de <i>Beauveria bassiana</i> (Damas, 2012). .....  | 5  |
| <b>Tabla 3.</b> Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos (Araujo y de Albuquerque, 2009). .....   | 9  |
| <b>Tabla 4.</b> Grupos funcionales de metabolitos secundarios fúngicos determinados mediante FT-IR, algunos con coloración roja. ....                        | 17 |
| <b>Tabla 5.</b> Evaluación cualitativa de la presencia de pigmentos en las fermentaciones líquidas de <i>Beauveria bassiana</i> DS3.17. ....                 | 29 |
| <b>Tabla 6.</b> Grupos funcionales detectados mediante espectroscopía de infrarrojo en el pigmento rojo producido por <i>Beauveria bassiana</i> DS3.17. .... | 44 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Estructuras morfológicas de <i>Beauveria bassiana</i> : A) Proliferación simpodial del conidióforo. B) Esporas esféricas. C) Conidióforo completo (Modificado de Rehner <i>et al.</i> , 2011).....   | 6  |
| <b>Figura 2.</b> Proceso infectivo resumido para hongos entomopatógenos. A) El hongo produce conidios más aéreos en el exterior del insecto. B) La espora aérea se dispersa, aterriza en la cutícula del insecto. C) La espora germina, penetra en la cutícula del insecto (modificado de Jaronski, 2014).....  | 8  |
| <b>Figura 3.</b> Estructura química beauvericina (PubChem, 2020).....   | 11 |
| <b>Figura 4.</b> Estructura química oosporeína (PubChem, 2020). .....   | 13 |
| <b>Figura 5.</b> Pigmentación en diferentes medios con fermentación líquida de <i>Beauveria bassiana</i> DS3.17. Caldo Papa Dextrosa Artesanal (CPDA1), Caldo Papa Dextrosa Artesanal con extracto de levadura (CPDA2), Caldo Papa Comercial (CPC1), Caldo Papa Comercial con extracto de levadura (CPC2), Caldo Czapek-dox (CCZ1), Caldo Czapek-dox con extracto de levadura (CCZ2), Caldo Sabouraud Dextrosa (CSD1) y Caldo Sabouraud Dextrosa con extracto de levadura (CSD2). ..... | 30 |
| <b>Figura 6.</b> Producción de biomasa de <i>Beauveria bassiana</i> DS3.17 en fermentación líquida con medios sin extracto de levadura: Caldo Sabouraud Dextrosa (CSD1) (◊), Caldo Papa Artesanal (CPDA1) (■), Caldo Papa Comercial (CPC1) (▲) y Caldo Czapek-dox (CCZ1) (X).. .....  | 33 |
| <b>Figura 7.</b> Producción de biomasa por <i>Beauveria bassiana</i> DS3.17 en fermentación líquida con extracto de levadura en medios: Caldo Sabouraud Dextrosa (CSD2) (◊), Caldo Papa Artesanal (CPDA2) (■), Caldo Papa Comercial (CPC2) (▲) y Caldo Czapek-dox (CCZ2) (X).. .....  | 35 |
| <b>Figura 8.</b> Producción de conidios de <i>Beauveria bassiana</i> DS3.17 en fermentación líquida sin extracto de levadura, medios: Caldo Sabouraud Dextrosa (CSD1) (◊), Caldo Papa Artesanal (CPDA1) (■), Caldo Papa Comercial (CPC1) (▲) y Caldo Czapek-dox (CCZ1) (X). .....   | 36 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 9.</b> Producción de conidios de <i>Beauveria bassiana</i> DS3.17 en fermentación líquida con extracto de levadura, medios: Caldo Sabouraud Dextrosa (CSD2) (◊), Caldo Papa Artesanal (CPDA2) (■), Caldo Papa Comercial (CPC2) (Δ) y Caldo Czapek-dox (CCZ2) (X)..... | 37 |
| <b>Figura 10.</b> Evolución del pH en los medios de cultivo: Caldo Sabouraud Dextrosa (CSD1) (◊), Caldo Papa Artesanal (CPDA1) (■), Caldo Papa Comercial (CPC1) (Δ) y Caldo Czapek-dox (CCZ1) (X) sin extracto de levadura con <i>Beauveria bassiana</i> DS3.17. ....           | 38 |
| <b>Figura 11.</b> Evolución del pH en los medios con extracto de levadura: Caldo Sabouraud Dextrosa (CSD2) (◊), Caldo Papa Artesanal (CPDA2) (■), Caldo Papa Comercial (CPC2) (Δ) y Caldo Czapek-dox (CCZ2) (X) de <i>Beauveria bassiana</i> DS3.17. ....                       | 39 |
| <b>Figura 12.</b> Espectro infrarrojo FT-IR del pigmento rojo de <i>Beauveria bassiana</i> DS3.17 extraído a los cuatro días de fermentación.....   | 41 |
| <b>Figura 13.</b> Espectro infrarrojo de extracto metanólico de <i>Beauveria bassiana</i> 1149 indicando la posibilidad de que sean compuestos de beauvericina, basianolida y/o oosporeína (Villegas-Mendoza <i>et al.</i> , 2019).....   | 45 |
| <b>Figura 14.</b> Espectro de absorción FT-IR del pigmento rojo oosporeína producido por <i>Beauveria bassiana</i> Nov. EO-1 con bandas de absorción a 1613, 3292, 1648 $\text{cm}^{-1}$ , obtenido a los 7 días de fermentación (Eyal <i>et al.</i> , 1994).....               | 45 |
| <b>Figura 15.</b> Espectros infrarrojos de tenellina y bassianina obtenidos por <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Beauveria tenella</i> extraídos a los 14 días de cultivo (El Basyouni <i>et al.</i> , 1968) .....  | 45 |
| <b>Figura 16.</b> Espectro de masas de alta resolución utilizando fuente de ionización por electronebulización (ESI) en modo negativo del pigmento rojo obtenido por <i>Beauveria bassiana</i> DS3.17 cultivado durante 4 días.....   | 46 |
| <b>Figura 17.</b> Análisis por HPLC-MS del metabolito secundario identificado como oosporeína, obtenido del extracto de cultivo de <i>Beauveria brongniartii</i> (IMBST 95041) cultivado en reactor de tanque agitado durante 4 días (Strasser <i>et al.</i> , 2000a).....      | 46 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                           |   |
|---------------------------|---|
| ATPasas                   | Adenosintrifosfatasa                                  |
| <i>B. bassiana</i>        | <i>Beauveria bassiana</i>                             |
| <i>B. brongniartii</i>    | <i>Beauveria brongniartii</i>                         |
| CCZ                       | Caldo czapek-dox                                      |
| CPC                       | Caldo papa comercial                                  |
| CPDA                      | Caldo papa dextrosa artesanal                         |
| CSD                       | Caldo sabouraud dextrosa                              |
| EL                        | Extracto de levadura                                  |
| ESI                       | Ionización por electronebulización                    |
| FHS                       | Hormona foliculoestimulante                           |
| FL                        | Fermentación líquida                                  |
| FT-IR                     | Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier |
| g                         | Gramos  |
| g/L                       | Gramos por litro                                      |
| H                         | Horas   |
| HPLC                      | Cromatografía de líquidos de alta eficacia            |
| L/h                       | Litros por hora                                       |
| LH                        | Hormona luteinizante                                  |
| <i>m/z</i>                | Relación masa carga                                   |
| mBar                      | Milibar   |
| MeCN                      | Acetonitrilo  |
| mg/L                      | Miligramos por litro                                  |
| $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ | Microgramos por microlitros                           |
| $\mu\text{L}/\text{min}$  | Microlitros por minuto                                |
| $\mu\text{m}$             | Micrómetro  |
| Min                       | Minutos   |

|             |                              |
|-------------|------------------------------|
| MIP         | Manejo integrado de plagas   |
| mL          | Mililitros                   |
| MS          | Espectrometría de masas      |
| ng/ $\mu$ L | Nanogramos por microlitros   |
| nm          | Nanómetros                   |
| OP          | Organofosforados             |
| p/p         | Relación peso/peso           |
| p/v         | Relación peso/volumen        |
| PDA         | Agar papa dextrosa           |
| pH          | Potencial hídrico            |
| RMN         | Resonancia magnética nuclear |
| rpm         | Revoluciones por minuto      |
| SD          | Sabouraud dextrosa           |
| SPE         | Extracción en fase sólida    |
| UV          | Luz ultravioleta             |

## RESUMEN

Los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de producir una serie de metabolitos secundarios de importancia en la industria biotecnológica ya que algunos de estos compuestos incrementan la virulencia de los hongos sobre insectos plaga lo cual tiene un gran impacto para el análisis de nuevas cepas y medios de cultivo que serán empleados en el control biológico. En este trabajo, se tuvo como objetivo evaluar el efecto de distintos medios de cultivo sobre la producción de pigmentos de *Beauveria bassiana* DS3.17 mediante fermentación líquida. Los cuatro medios de cultivo evaluados presentaron diferencias significativas sobre la producción de pigmentos y el crecimiento de *Beauveria bassiana* DS3.17, siendo el medio Papa comercial el que presentó el mejor crecimiento. El medio Sabouraud dextrosa con extracto de levadura al 0.05% m/v (CSD2) presentó la mayor pigmentación roja. Los medios Czapek-dox con y sin extracto de levadura al 0.05% m/v (CCZ1 y CCZ2) no pigmentaron, la extracción del pigmento se realizó al cuarto día de fermentación. Se obtuvo un rendimiento de 26.52 mg/L del pigmento purificado el cual se identificó mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) mostrando la presencia de bandas en  $3276.88\text{ cm}^{-1}$  (OH),  $2926.96\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_3$ ),  $1631.41\text{ cm}^{-1}$  (alqueno y/o carbonilo),  $1520.60\text{ cm}^{-1}$  (alquenos y/o aromáticos),  $1449.78\text{ cm}^{-1}$  (alcano),  $1236.50$  (éster) y  $1039.04\text{ cm}^{-1}$  (amina). Se purificó el pigmento por SPE, fue analizado mediante espectrometría de masas de alta resolución utilizando fuente de ionización por electronebulización (ESI) en modo negativo. Se encontró un ión mayoritario con  $m/z$  305.0302 que corresponde a una fórmula molecular  $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{O}_8$  y que coincide con la composición de la oosporeína  $[\text{M-H}]^-$ .

## ABSTRACT

Entomopathogenic fungi have the capacity to produce a series of secondary metabolites which are important in the biotechnological industry because some of these compounds increase the virulence of the fungus on the plague insects, which has a great impact for the analysis of new strains and culture media that would be employed in biological control. The objective of this work was to evaluate the effect of different culture media on the production of pigments of *Beauveria bassiana* DS3.17 by liquid fermentation. The four evaluated culture media presented significant differences on the production and growth of *Beauveria bassiana* DS3.17 pigments, and was the commercial potato medium which presented the best growth rate. The Sabouraud dextrose medium with yeast extract at 0.05% m/v (CSD2) presented the greatest red pigmentation. The media Czapek-dox with and without yeast extract at 0.05% m/v (CCZ1 and CCZ2) did not pigment, the extraction of the pigment was carried out the fourth day of fermentation. It was obtained a yield of 26.52 mg/L of the purified pigment which was identified by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) showing the presence of bands in  $3276.88\text{ cm}^{-1}$  (OH),  $2926.96\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_3$ ),  $1631.41\text{ cm}^{-1}$  (alkene and/ or carbonyl),  $1520.60\text{ cm}^{-1}$  (alkene and/or aromatics),  $1449.78\text{ cm}^{-1}$  (alkane)  $1236.50$  (ester) and  $1039.04\text{ cm}^{-1}$  (amine). The pigment was purified by SPE, analyzed by high resolution mass spectrometry using an ionization source by electrospray macro molecule ionization (ESI) in negative mode. A majority ion with a  $m/z$  of 305.0302 that corresponds to a molecular formula  $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{O}_8$  and coincides with the composition of the oosporein  $[\text{M-H}]^-$  was found.

## 1. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas a los que se enfrenta la sociedad actual, es el uso excesivo de plaguicidas de origen sintético, que ocasionan daños al ecosistema como: disminución en la fertilidad del suelo, efectos adversos en poblaciones de insectos benéficos, contaminación de los mantos freáticos, problemas en la salud humana y del ganado (Rohlf s y Churchill, 2011). Por lo anterior se han desarrollado métodos físicos, químicos, biológicos, genéticos y/o culturales para el control de plagas, denominados en conjunto como manejo integrado de plagas (MIP) (Ballesteros-Torres, 2013), aceptable de manera económica, ecológica y toxicológica (Vianna, 2019). Dentro del MIP se encuentra el control biológico, que permite disminuir el uso de insecticidas sintéticos (Cañedo *et al.*, 2011). Durante el año 2017 se utilizaron aproximadamente 47127.77 toneladas de plaguicidas en México (FAOSTAT, 2019). El control biológico emplea organismos o componentes de estos para reducir la densidad poblacional de las plagas, con el objetivo de minimizar los costos que derivan de la utilización de insecticidas sintéticos, sin dañar al ambiente ni al humano (Lacey *et al.*, 2015). Los agentes de control biológico se agrupan en depredadores, parasitoides y patógenos dentro de los últimos, se encuentran: hongos, virus, bacterias, y nematodos, los primeros tienen la ventaja de invadir al huésped por contacto (Gutiérrez-Ramírez *et al.*, 2013), lo que incrementa las posibilidades de que se desarrolle la infección (Montesinos-Matías *et al.*, 2011). Los hongos entomopatógenos se presentan como una alternativa para el control de vectores de enfermedades (Fernández *et al.*, 2011). Tienen la capacidad de infectar a una gran variedad de insectos, también producen toxinas y enzimas hidrolíticas (Amin *et al.*, 2010). La mayoría de los estudiados, se han aislado de cadáveres de insectos y suelos. En este contexto, el género *Beauveria* se ha empleado con éxito a nivel de laboratorio y en pruebas de campo (Schapovaloff *et al.*, 2014). Sin embargo, existe un interés en los distintos metabolitos que produce *Beauveria bassiana*, con la capacidad de pigmentar el medio de cultivo para su extracción y futuras aplicaciones en programas de control biológico.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Control Biológico

Para 2050 se prevé que la población mundial aumentará alcanzando los 10 mil millones de personas (FAO, 2020), debido a esto y al cambio de dieta en los países en desarrollo, la demanda de alimentos se elevará. Sin embargo, a nivel mundial se pierde en promedio el 40% de los cultivos alimentarios, debido a plagas y enfermedades vegetales, que no pueden ser controladas en su totalidad (ONU, 2020).

En los últimos 100 años la agricultura se ha vuelto masiva para satisfacer las necesidades mundiales de alimentos. Se espera que la demanda de cereales para alimentación humana y animal llegue a 3 mil millones de toneladas en 2050 (FAO, 2009). Sin embargo, la dependencia a agroquímicos sintéticos para satisfacerla produce daños al ambiente, la salud humana y animal. Cada plaguicida tiene propiedades y efectos toxicológicos distintos. El uso de pesticidas organofosforados (OP) a elevadas concentraciones pueden ocasionar daños a hormonas como FHS y LH (Recio *et al.*, 2005). También en México se han detectado residuos de pesticidas organoclorados en sangre de mujeres embarazadas (Rodríguez-Dozal *et al.*, 2012). Dando como resultado trastornos hormonales, alteraciones genéticas y del comportamiento (García Hernández *et al.*, 2018). H. S. Smith fue quién utilizó el término “control biológico” por primera vez en 1919, para referirse al uso de enemigos naturales (introducidos o manipulados) para el control de insectos plaga (Rodríguez-del-Bosque y Arredondo-Bernal, 2007). El control biológico tiene como objetivo disminuir las poblaciones de plagas hasta densidades bajas, causando un cambio de forma temporal o permanente en los sistemas alimentarios que rodean a la plaga (Van Driesche *et al.*, 2009).

Hay tres tipos de control biológico (Van Lenteren, 2012):

- ✓ Clásico.
- ✓ Conservativo.
- ✓ Aumentativo.

Existen combinaciones de estas metodologías para obtener resultados, económicamente competitivos para el productor. Desde el punto de vista agronómico, existen desafíos que aún necesitan ser resueltos. Uno importante para los investigadores y la industria, es el desarrollo de nuevos agentes de control biológico y formulados de calidad (Bettioli *et al.*, 2014). Es importante mencionar que los intentos de controlar insectos plaga han cambiado con el tiempo, de productos químicos a métodos de control naturales. Dentro del control biológico es común el uso de hongos entomopatógenos, una de las técnicas más eficaces debido a que viven y se desarrollan en los insectos, provocando su muerte de manera natural (Shahid *et al.*, 2012). Se han considerado controladores importantes debido al amplio rango de huéspedes que pueden combatir (Pacheco-Hernández *et al.*, 2019).

## 2.2 Hongos Entomopatógenos

Los hongos están conformados por grupos, heterotróficos, unicelulares o hifales (filamentosos), pueden reproducirse mediante esporas sexuales, asexuales o ambas (Araujo y de Albuquerque, 2009). Pertenecen al reino mycota están agrupados en cuatro subdivisiones: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota* (Bich *et al.*, 2015). Se tiene conocimiento del uso de hongos entomopatógenos (*entomos* “insecto”, *patho* “dolencia o afección” y *geno* “genera o produce”) para el control de diversas plagas en el sector agrícola (Pacheco-Hernández *et al.*, 2019; García-Carrucini *et al.*, 2017). Agostino Bassi en 1836, escribió un tratado sobre la enfermedad del gusano de seda conocida como muscardina, siendo el agente causal de esta *Beauveria bassiana*. Colocando a este hongo como un agente potencial con actividad insecticida (Marín-Cruz *et al.*, 2017). Se conocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies de hongos entomopatógenos, entre los géneros más importantes están *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium* (Ramos, 2016).

De manera general, el ciclo infectivo de estos hongos se inicia con la fijación de la unidad infectiva (conidio o espora) a la cutícula, la germinación de esta, posteriormente el crecimiento dentro del insecto, dando como resultado la muerte

del huésped. Después de este proceso y si las condiciones ambientales son adecuadas, el hongo emerge y produce esporas o conidios que infectan a más insectos continuando con el ciclo infectivo (Araujo y de Albuquerque, 2009). Los hongos entomopatógenos producen cuerpos hifales, lo que les permite invadir otros tejidos del insecto huésped por el extenso crecimiento vegetativo y la producción de toxinas, que son metabolitos secundarios con capacidad bioactiva, que generan una respuesta tóxica en los organismos (Damas, 2012). Por ejemplo, *Beauveria brongniartii* la cual provoca que el cadáver del huésped presente una coloración roja (Zimmermann, 2007).

Los hongos producen una gran cantidad de compuestos de bajo peso molecular, metabolitos secundarios, los cuales participan en una serie de procesos celulares, como transcripción, desarrollo y comunicación intracelular (Reverberi *et al.*, 2010). Dichos metabolitos son estructuralmente heterogéneos. Es posible que la evolución de éstos se debiera a que los microorganismos los utilizaban como señales químicas en la comunicación, para defender su habitat o para detener el crecimiento de los competidores (Brakhage, 2013). *Beauveria brongniartii* produce toxinas, como beauvericina (un hexadepsipéptido) que muestra actividad antibacteriana e insecticida, oosporeína, bassianina y tenellina (Strasser *et al.*, 2000a) estos últimos pigmentos inhiben ATPasas de la membrana de los eritrocitos (Brakhage, 2013).

### **2.2.1 *Beauveria bassiana***

Su historia comienza en el año 1835 cuando Agostino Bassi di Lodi demuestra que este hongo puede causar enfermedades a insectos, él observó una enfermedad en gusanos de seda *Bombyx mori*, a la que denominó “muscardina blanca” (Zimmermann, 2007). Se sabe que *B. bassiana* infecta a una variedad de insectos plaga, entre las que destacan plagas de importancia económica, como se describe en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Plagas controladas en cultivos de importancia agrícola por *Beauveria bassiana* (Pacheco-Hernández *et al.*, 2019).

| Plaga  | Cultivo                |
|--|------------------------|
| Broca del café: <i>Hypothenemus hampei</i>   | Café                   |
| Chinche Lygus: ninfas de <i>Lygus lineolaris</i>   | Fresa                  |
| Conchuela del frijol: <i>Epilachna varivestis</i>  | Frijol                 |
| Chapulines: <i>Brachystola magna</i> y <i>B. mexicana</i>  | Frijol                 |
| Mosquita blanca: <i>Bemisia tabaci</i>   | Hortalizas             |
| Insecto plaga de los frutos de <i>Jatropha curcas</i> (Diana trapeador) <i>Pachycoris torridus</i> . | <i>Jatropha curcas</i> |
| Palomilla del manzano: <i>Cydia pomonella</i>  | Manzana                |
| Picudo del nopal: <i>Metamasius spinolae</i>   | Nopal                  |

#### 2.2.1.1 Taxonomía

Es un hongo anamórfico que produce conidios hialinos esféricos, patógeno de artrópodos. Filogenéticamente está asociado con la familia *Cordycipitaceae* del orden *Hypocreales*. Así mismo, se ha reportado que *B. bassiana* y *B. brongniartii* están ligados en cuanto al desarrollo y filogenéticamente con las especies de *Cordyceps* (Rehner *et al.*, 2011). En la Tabla 2 se describe su taxonomía.

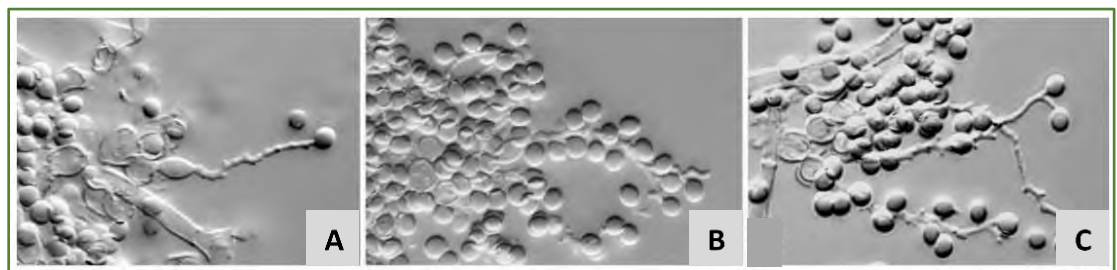
**Tabla 2.** Taxonomía de *Beauveria bassiana* (Damas, 2012).

|            |                          |
|------------|--------------------------|
| Reino      | <i>Fungi</i>             |
| Sub-reino  | <i>Dikarya</i>           |
| Filium     | <i>Ascomycota</i>        |
| Sub-filium | <i>Pezizomycotina</i>    |
| Clase      | <i>Sordariomycetes</i>   |
| Sub-clase  | <i>Hypocreomycetidae</i> |
| Orden      | <i>Hypocreales</i>       |
| Familia    | <i>Cordycipataceae</i>   |

|         |                           |
|---------|---------------------------|
| Género  | <i>Cordyceps</i>          |
| Especie | <i>Beauveria bassiana</i> |

### 2.2.1.2 Morfología

Es un organismo heterótrofo, con células quitinizadas presenta hifas septadas, con diámetro de 2.5 a 25  $\mu\text{m}$ , mediante ellas se generan conidióforos simples (estructuras reproductivas) que están raramente acoplados, con aspecto de jarrón (uno de los extremos más estrecho) los cuales sostienen a los conidios y se originan de forma simpodial o acrópeta, dando una forma de zigzag (Ballesteros-Torres, 2013). En la Figura 1 se muestran las estructuras morfológicas de *Beauveria bassiana*. Descritas por Rehner *et al.*, (2011) quienes emplearon un microscopio óptico Nikon Eclipse E600 con el software NIS Elements Basic Research 2.30, SP4 (Nikon) identificaron colonias de 15 a 42 mm de diámetro, hifas septadas ramificadas, hialinas de 1 a 2  $\mu\text{m}$  de ancho. Células conidiógenas solitarias, pero generalmente en grupos densos de cinco o más, base subesférica de 3 a 6  $\mu\text{m}$  de ancho, ápice con un raquis de 1  $\mu\text{m}$  de ancho, producido lateralmente en hifas aéreas o de células subtiende principalmente de 2.5 a 6  $\mu\text{m}$  por 3 a 6  $\mu\text{m}$ .



**Figura 1.** Estructuras morfológicas de *Beauveria bassiana*: A) Proliferación simpodial del conidióforo. B) Esporas esféricas. C) Conidióforo completo (Modificado de Rehner *et al.*, 2011).

### 2.2.1.3 Mecanismo de infección

La infección causada por *Beauveria bassiana* sobre insectos se lleva a cabo mediante las siguientes etapas (Ballesteros-Torres, 2013).

1) Adhesión. Es el primer paso en el proceso infeccioso, inicia con la unión del conidio a la cutícula del huésped. La cual es controlada por las propiedades hidrofóbicas de la pared celular de los conidios, para *Beauveria bassiana* estas propiedades se deben a la presencia de hidrofobinas (Araujo y de Albuquerque, 2009).

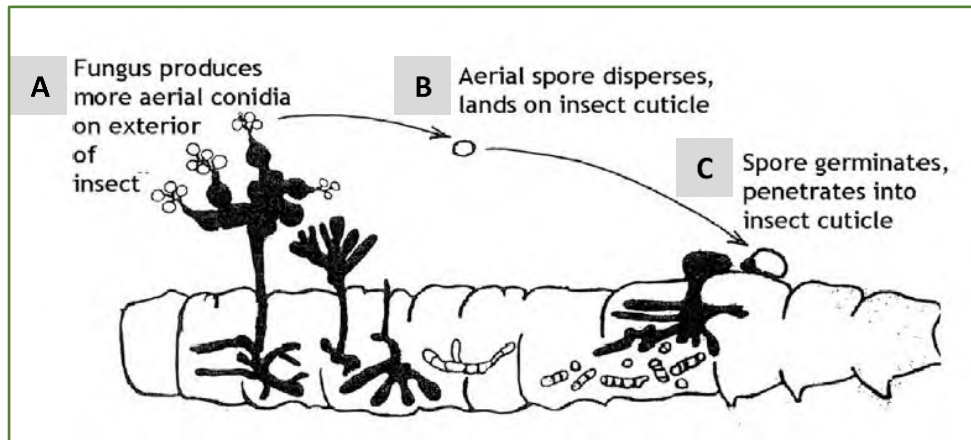
2) Germinación. Ocurre después de 18 horas, cuando el conidio encuentra condiciones ambientales favorables: humedad, temperatura, nutrientes esenciales, fuente de carbono como la quitina y niveles adecuados de ácidos grasos (Ramos, 2016).

3) Penetración. En esta etapa, ocurren dos procesos, uno físico y otro químico. El primero consiste en la presión que ejerce la hifa sobre las zonas membranosas o mínimamente esclerosadas del insecto. El segundo es la secreción de enzimas hidrolíticas: proteasas, lipasas y quitinasas que facilitan la descomposición del tegumento. El ano y la boca son zonas comunes de penetración debido a sus características que favorecen la infección (Téllez-Jurado *et al.*, 2009).

4) Multiplicación. Se producen cuerpos hifales y protoplastos (sin pared celular), que no son detectados por los hemocitos del insecto, resultando en la dispersión del hongo para adquirir nutrientes (Nava-Pérez *et al.*, 2012).

5) Producción de toxinas. Para provocar la muerte del insecto con mayor rapidez el hongo produce toxinas, las cuales también interfieren con los mecanismos de defensa del huésped (González-Castillo *et al.*, 2012).

6) Muerte del insecto. Puede deberse a varios factores como agotamiento de nutrientes, pérdida de líquidos, bloqueo en el tracto digestivo por acción enzimática producida por el hongo, etc. (Rohlfis y Churchill, 2011). El periodo en que ocurre la muerte puede variar de 3 a 5 días (Carrillo-Rayas y Blanco-Labra, 2009). En la Figura 2 se muestra el proceso infeccioso resumido para hongos entomopatógenos.



**Figura 2.** Proceso infeccioso resumido para hongos entomopatógenos. A) El hongo produce conidios más aéreos en el exterior del insecto. B) La espóra aérea se dispersa, aterriza en la cutícula del insecto. C) La espóra germina, penetra en la cutícula del insecto (modificado de Jaronski, 2014).

### 2.3 Metabolitos secundarios

Existe interés en la detección de nuevos metabolitos secundarios con aplicaciones en la industria agroquímica y farmacéutica. Entre los microorganismos, los hongos y las bacterias producen estos metabolitos con importante actividad biológica (Saxena, 2014). Los hongos entomopatógenos producen una amplia variedad de ellos, químicamente diversos (Thirumurugan *et al.*, 2018).

Debido a su baja toxicidad para el ser humano, el aislamiento de estos metabolitos ha sido muy importante para la producción de formulados biológicos (García-Gutiérrez y González-Maldonado, 2010; Acuña *et al.*, 2015), los hongos entomopatógenos producen una serie que pueden ser manipulados mediante la optimización de las condiciones del cultivo: pH, temperatura, tipo y concentración de nutrientes etc. (Borges *et al.*, 2010; Strasser *et al.*, 2000a). Abarcan una serie (Khan *et al.*, 2014), que son de gran importancia en la diversificación y adecuación de los hongos a nichos ecológicos especializados. Lo cual incrementa su interés, por su diversidad, funcional para ser empleados en una variedad de procesos biotecnológicos (Luo *et al.*, 2015).

Existe una gran cantidad de hongos que producen metabolitos secundarios, de los cuales muchos han evidenciado que poseen actividad biológica sobre otros organismos (Mao *et al.*, 2010; Cole *et al.*, 1974), actividad insecticida (Villegas-

Mendoza *et al.*, 2019; Amin *et al.*, 2010) e inmunosupresora y bioactivos (insecticida y antimicrobiana) dentro de estos se encuentran oosporeína (pigmento rojo), tenellina (pigmento amarillo), bassianina (pigmento amarillo), ácido oxálico, efrapeptinas, beauvericinas, beauverólidos, destruxinas, eniantinas, ciclosporinas, pyridoyericina y pyridomacrolidina (Damas, 2012; Strasser *et al.*, 2000b). Para poder estudiarlos, se han extraído mediante filtrados de cultivos, utilizando disolventes de bajo peso molecular (Mc Namara *et al.*, 2019; El Basyouni y Vining, 1966). Beauvericina, bassiacridina, oosporeína, ciclosporina A y basianolida se han extraído de cultivos miceliales. (Borges *et al.*, 2010; Quesada-Moraga y Vey, 2004). *B. bassiana* también, secreta ácido oxálico que se considera un determinante importante de patogenicidad porque puede solubilizar proteínas cuticulares específicas. Existe la hipótesis de que la secreción de ácido oxálico, conduce a la reducción del pH en el medio, actuando como un potente factor acaricida durante la patogénesis (Zimmermann, 2007). A continuación (Tabla 3) se describen los metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos.

**Tabla 3.** Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos (Araujo y de Albuquerque, 2009).

| Hongo                         | Blanco  | Tipo de compuesto | Metabolitos producidos <i>in vitro</i> y/o <i>in vivo</i> |
|-------------------------------|---------|-------------------|---|
| <i>Metarhizium anisopliae</i> | Insecto | Toxina            | Destruxinas (más de 27 tipos)                             |
|                               |         | Toxina            | Ácido oxálico   |
|                               |         | Toxina            | Citocalasina C  |
|                               |         | Toxina            | Swainsinona   |
| <i>Beauveria bassiana</i>     | Insecto | Toxina/Pigmento   | Bassianina  |
|                               |         | Toxina            | Beauvericina  |
|                               |         | Toxina            | Basianólido   |
|                               |         | Toxina            | Beauverólidos   |
|                               |         | Toxina/Pigmento   | Tenellina   |
|                               |         | Toxina            | Ácido oxálico   |
| <i>Beauveria brongniartii</i> | Insecto | Toxina/Pigmento   | Oosporeína  |
|                               |         | Toxina            | Ácido oxálico   |
|                               |         | Toxina/Pigmento   | Oosporeína  |
|                               |         | Toxina            | Bassiacridina   |
| <i>Beauveria brongniartii</i> | Insecto | Toxina/pigmento   | Oosporeína  |
|                               |         | Toxina            | Ácido oxálico   |
|                               |         | Toxina            | Ácido oxálico   |

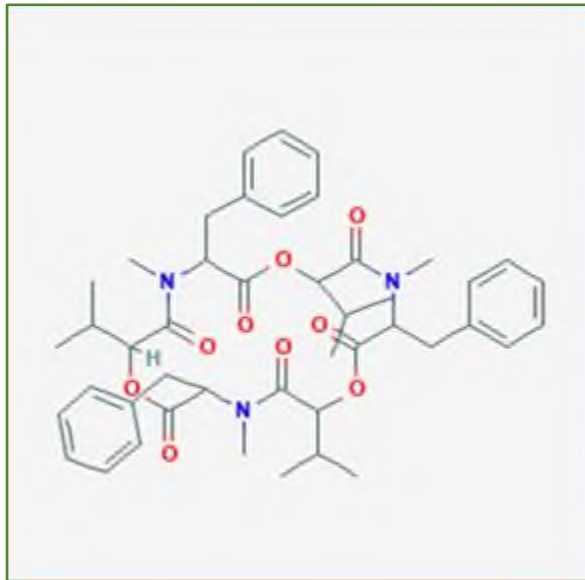
|                              |                   |        |                          |
|------------------------------|-------------------|--------|--------------------------|
| <i>Isaria fumosorosea</i>    |                   | Toxina | Ácido dipicolínico       |
|                              |                   | Toxina | Beauvericina             |
|                              |                   | Toxina | Beauverólidos            |
| <i>Lecanicillium lecanii</i> | Insecto           | Toxina | Ácido dipicolínico       |
|                              |                   | Toxina | Ácido hidroxicarboxílico |
|                              |                   | Toxina | Ácido oxálico            |
|                              |                   | Toxina | Ciclosporina             |
| <i>Tolypocladium spp</i>     | Insectos          | Toxina | Ciclosporina             |
|                              |                   | Toxina | Efraeptinas (5 tipos)    |
| <i>Hirsutella thompsonii</i> | Insectos y ácaros | Toxina | Hirsutellina A           |
|                              |                   | Toxina | Hirsutellina B           |
|                              |                   | Toxina | Phomalactona             |

### 2.3.1 Micotoxinas

*Beauveria bassiana* produce una gran variedad de metabolitos secundarios biológicamente activos, que son estudiados para su probable aplicación en medicina (Hussain *et al.*, 2020; Patocka, 2016). Se conocen siete tipos diferentes de beauvericina: beauvericina (VII), beauvericina A, B, y C, y allobeauvericina A, B, y C (Bycroft y Payne, 2014). Los principales metabolitos secundarios empleados de manera comercial para el biocontrol de plagas de insectos son: beauvericina, bassiacridina, enzimas hidrolíticas (Cortés-Sánchez y Mosqueda-Olivares, 2013). A continuación, se describen algunos de estos metabolitos.

#### 2.3.1.1 Beauvericina

Es un ciclopéptido, fue la primera toxina caracterizada y extraída del micelio de *Beauveria bassiana*; posteriormente aislada de otros hongos; en su biosíntesis interviene una enzima multifuncional constitutiva (eniatina sintetasa) (Liuzzi *et al.*, 2017; Borges *et al.*, 2010). En la Figura 3, se muestra su estructura química.



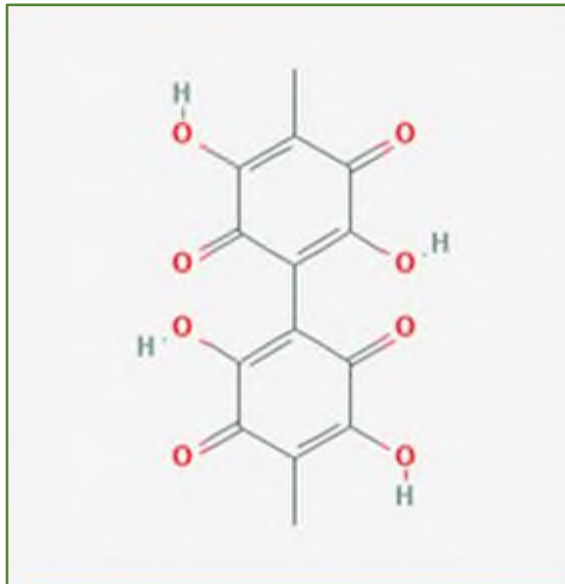
**Figura 3.** Estructura química beauvericina (PubChem, 2020).

Se ha observado su efecto insecticida contra *Hypothenemus hampei* (Broca del café) (Arboleda *et al.*, 2003). Así como su potencial para ser usado en la industria biotecnológica (Shin *et al.*, 2009; Wang y Xu, 2012). Es considerado uno de los depsipéptidos de gran importancia producido por hongos, ya que presenta actividad potencializadora contra *Candida albicans* (Fukuda *et al.*, 2004). Existen análogos del compuesto obtenidos a partir de *Fusarium* e *Isaria spp* (beauvericina A y su isómero estructural beauvericina F, beauvericina C, beauvericina J, beauvericina D y beauverenniatina A) (Urbaniak *et al.*, 2019). Se cree que el mecanismo de acción de beauvericina consiste en incapacitar al sistema inmunológico de insectos durante la infección (Rohlfes y Churchill, 2011) junto con tenellina no contribuyen a la virulencia de *Beauveria bassiana* (Mc Namara *et al.*, 2019). Actúan de manera específica en ciertos grupos de insectos, su mecanismo es gracias a la combinación de compuestos (Zimmermann, 2007).

### 2.3.1.2 Oosporeína

Derivado de la 1,4-dibenzoquinona fue identificado por primera vez en la década de 1960. Dicha toxina es altamente reactiva para muchos organismos (Feng *et al.*, 2015; Strasser *et al.*, 2000b). Oxida proteínas y aminoácidos cambiando los grupos SH lo que

resulta en un mal funcionamiento de las enzimas (Strasser *et al.*, 2000a). Debido a los grupos hidroxilo de estructura química de la oosporeína puede conferirle una fuerte actividad antioxidante que puede aumentar de manera en función del incremento en la dosis (Alurappa *et al.*, 2014). El mecanismo de acción del metabolito promueve la infección en lugar de matar directamente a los insectos. Exhibe propiedades inmunosupresoras que pueden tener potencial para el control de plagas al promover una mortalidad más rápida. La adición de oosporeína en el medio de cultivo, induce su producción (Mc Namara *et al.*, 2019). Se detecta entre 24 y 48 h después de la muerte del insecto. Es uno de muchos metabolitos secundarios de gran interés por su propiedad para pigmentar en color rojo. Muestra potente actividad antimicrobiana hacia la flora bacteriana del huésped, lo que impide que se reproduzcan bacterias en los cadáveres para que el hongo pueda completar su ciclo de vida (Fan *et al.*, 2017). Debido a los grupos hidroxilo en su estructura, se le atribuye actividad antioxidante, por lo que inhibe bacterias gram negativas (Alurappa *et al.*, 2014). Cuantificada mediante HPLC en una columna de fase inversa, unida a un detector de matriz de diodos se detectó a 287 nm (Strasser *et al.*, 2000). Máxima absorción con espectro ultravioleta en etanol fue de 216 y 287 nm, en metanol a 208 y 291 nm. (Cole *et al.*, 1974). Sin embargo, para pigmentos rojos se detectaron con longitudes de onda aproximadas de 500 nm, otros autores evalúan pigmentos con longitudes de 400-700 nm (Méndez-Zavala *et al.*, 2007). Aunque específicamente oosporeína se detectó en espectro UV-vis a 281nm (Alurappa *et al.*, 2014). En la Figura 4 se muestra su estructura química.



**Figura 4.** Estructura química oosporeína (PubChem, 2020).

## 2.4 Fermentación líquida

La fermentación es una metodología para la producción de compuestos bioactivos de interés industrial. Sin embargo, debido a sus variaciones técnicas, es necesario comparar e identificar procesos que mantengan la productividad y reduzcan costos (Subramaniyam y Vimala, 2012). En la fermentación líquida (FL), los nutrientes deben ser solubles en agua. Un factor importante es la agitación, ya que distribuye el oxígeno en el medio e impide que se produzcan zonas anaerobias (Amin *et al.*, 2010), sin ella hay crecimiento solo en la superficie. Mata y Barquero (2010) evaluaron la producción de *B. bassiana* en medio líquido para el control de la broca del café (*Hypothenemus hampei*), reportando que un medio de cultivo con azúcar, extracto de levadura y peptona favoreció el crecimiento del hongo, generando una mortalidad del 86.7%. Así como el efecto de la fuente de carbono y nitrógeno, obteniendo que los tratamientos con concentraciones medias y altas de carbono permitieron obtener rendimientos superiores a aquellos que tenían bajas concentraciones de carbono. Rosas-Ramos, (2018) evaluó la producción de 8 cepas fúngicas las cuales provinieron de muestras de suelo (*Talaromyces wortmanii* LMB-HP14, *Penicillium mallochii* LMB-HP19, *Penicillium maximae* LMB-HP33, *Penicillium mallochii* LMB-HP37, *Talaromyces brunneus* LMB-HP43, *Aspergillus amoenus* LMB-HU1, *Trichoderma ressei* LMB-HL1,

*Trichoderma spp.* LMB-HL2) productoras de colorantes en medio caldo papa dextrosa (papa 5% p/v, glucosa 20% p/v) durante un período de 7 días a 28°C, a 180 rpm en agitador orbital, para verificar la producción de colorantes se utilizó como control negativo el medio caldo papa dextrosa filtrado. Se obtuvieron los espectros de absorción con un rango UV-VIS (200 nm a 800 nm) de los colorantes producidos por fermentación sumergida, así como los extraídos a partir de biomasa, utilizando el espectrofotómetro de UV/Visible con arreglo de diodos y se determinaron las longitudes de onda entre 368 nm a 378 nm. Apreciando colores anaranjados, amarillos, rojos y marrones. Strasser *et al.*, (2000a) identificaron metabolitos secundarios empleando aislados de *Beauveria brongniartii* en medio líquido Sabouraud glucosa al 2%, con una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios/mL, incubados a 25°C a 150 rpm durante 6 días, dicho cultivo se utilizó para inocular (10% v/v) un reactor de tanque agitado de 14 L, que contenía medio Sabouraud-glucosa al 2%, pH 6 y 0.05% antiespumante Silicon 289, durante 4 días para su posterior extracción. Amin *et al.*, (2010) extrajeron 480 mg/L de pigmento rojo con *Beauveria bassiana* en fermentación líquida después de 7 días a 27°C, también evaluaron la actividad insecticida del extracto rojo sobre *Bemisia tabaci* en estadios de ninfa, pupa y adulto. El pigmento se determinó por espectrofotometría UV visible a una longitud de onda de 530 nm. Basyouni *et al.*, (1968) evaluaron la producción de pigmentos de *Beauveria* mediante fermentación líquida empleando distintos medios: Medio A: D-Glucosa (20 g/L), tartrato de amonio (4.6 g/L), fosfato monopotásico (1 g/L), sulfato de magnesio (0.5 g/L), cloruro de sodio (0.1 g/L), cloruro de calcio (0.1 g/L), sulfato de cobre pentahidratado ( $3.93 \times 10^{-4}$  g/L), ácido bórico ( $5.7 \times 10^{-7}$  g/L), molibdato de amonio ( $3.68 \times 10^{-7}$  g/L), sulfato de manganeso ( $6.1 \times 10^{-7}$  g/L), sulfato de zinc ( $8.79 \times 10^{-3}$  g/L) y sulfato de hierro heptahidratado ( $9.96 \times 10^{-4}$  g/L), durante 14 días a 25°C, a 220 rpm. Obteniendo que las cepas de *B. tenella* (HLX 76 y 515) y *B. bassiana* (HLX83) produjeron tenellina, así como *B. bassiana* (HLX 78 y 127) y *B. tenella* (HLX522) bassianina (pigmentos amarillos) con un rendimiento de hasta 60 mg/L. Medio B: D-Glucosa (20 g/L), neopeptona (20 g/L), glicina (5 g/L), fosfato monopotásico (2g/L), sulfato de magnesio (1 g/L) y medio C: Czapek-dox con D-Glucosa (20 g/L), ambos durante 14 días a 25°C, a 220 rpm. Las cepas *Beauveria bassiana* (HLX 77, 78, 79 y

127) y *Beauveria tenella* (HLX522) produjeron oosporeína (pigmento rojo), con un rendimiento de ambos medios de 100 mg/L, sin embargo, el medio B con cepa HLX522 obtuvo entre 60 y 146 mg/L. Villegas-Mendoza *et al.*, (2019) evaluaron la toxicidad de un extracto metanólico de *Beauveria bassiana* mediante fermentación líquida de medio Czapek-dox, cultivado durante 14 días a 26°C y 160 rpm. Indicando la posibilidad de que el extracto se encuentren compuestos como beauvericina, basianolida y oosporeína.

## **2.5 Técnicas de identificación de metabolitos secundarios**

Existe una variedad de compuestos coloridos producidos por hongos, sin embargo, es necesario que sean acidificados previamente y extraídos mediante técnicas cromatográficas empleando disolventes orgánicos como acetonitrilo, acetato de etilo, metanol, etc. que ayuden a disminuir la matriz de la muestra (Strasser *et al.*, 2000a; Nagaoka *et al.*, 2004; Villegas-Mendoza *et al.*, 2019). Para que los metabolitos puedan ser identificados mediante espectrometría de masas (MS), espectroscopía ultravioleta-visible (UV) y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) (Eyal *et al.*, 1994) Sin embargo, para ser analizados por resonancia magnética nuclear se debe concentrar el compuesto y tener un estándar (Mc Namara *et al.*, 2019).

### 3. ANTECEDENTES

La cepa utilizada en este estudio fue previamente aislada y caracterizada morfológicamente, se evaluó el aspecto macroscópico de las colonias con tinciones de safranina y azul de metileno, observando las estructuras a 20 y 40X, para determinación de género y especie. Para caracterización molecular se realizó la extracción de DNA ribosomal con el kit de extracción de ADN Ultra Clean; posteriormente se amplificaron los fragmentos ITS 6s-8s y una secuenciación de nueva generación en plataforma Illumina por López-Sosa *et al.*, (2019) denominada como *Beauveria bassiana* DS3.17. Los hongos producen una gran variedad de compuestos derivado del metabolismo secundario como: antibióticos, enzimas y algunos colorantes. Miembros del género *Monascus* son productores potenciales de pigmentos naturales empleando una fermentación que contenía glucosa 20 (g/L), glutamato monosódico (5.0 g/L), fosfato monopotásico (5.0 g/L), sulfato de magnesio heptahidratado (0.5 g/L), sulfato de hierro heptahidratado (0.01 g/L), sulfato de zinc heptahidratado (0.01 g/L), sulfato de manganeso heptahidratado (0.03 g/L) y cloruro de potasio (0.5 g/L) a 32°C en un agitador rotativo (150 rpm) durante 13 días. En el día 3 comenzó la producción de pigmento rojo y continuó acumulándose durante el periodo de fermentación. Así como el género *Pycnoporus* es productor de pigmentos con potencial uso en la biotecnología Cruz *et al.*, (2015) emplearon medio sólido agar papa dextrosa, agar extracto de malta, agar extracto de casuarina, agar harina de trigo integral y agar extracto de mango, las cajas inoculadas se incubaron durante 30 días a 23° a pH 7. Obteniendo un pigmento anaranjado en medio PDA a los 3, 13 y 30 días. Méndez-Zavala *et al.*, (2007) evaluaron la capacidad de *Penicillium purpurogenum* para producir pigmentos en nueve medios, para fermentación líquida utilizaron Czapek-dox con ácido tánico a pH 6.5, infusión de papa con ácido tartárico a pH 3.5, durante 7 días a 30°C y 200 rpm, extrayéndolos de acuerdo a las metodologías reportadas por Shin *et al.*, (1998), reportando pigmento rojo en medio infusión de papa al día 3 con una mayor pigmentación a los 8 días de la fermentación. La presencia de sacarosa, extracto de malta, ácido casamino, y una alta concentración de sales en los medios produjo un incremento en su coloración. La detección de los pigmentos

fue por espectrofotometría, las absorbancias máximas se encontraron en un intervalo de longitud de onda entre los 400-600 nm. Nagaoka *et al.*, (2004) detectaron oosporeína empleando caldo papa dextrosa después de 14 días en un cultivo a 25°C y en oscuridad reportando 125 mg/L del compuesto empleando la cepa *Verticillium psalliotae* MAFF 239144. La extracción se realizó con acetato de etilo y acetonitrilo (MeCN). Obteniéndose mediante espectrometría de masas un valor de  $m/z$  306 (ion negativo). Mc Namara *et al.*, (2019) determinaron que la oosporeína fue el principal metabolito secundario producido por *Beauveria caledonica*, obteniendo un rendimiento de 5 mg. Establecieron que la oosporeína en lugar de matar directamente a los insectos, tiene propiedades inmunosupresoras con potencial en el control de plagas, ya que la adición de oosporeína promueve su propia producción.

### 3.1 Espectroscopía Infrarroja de pigmentos fúngicos

Rosas-Ramos (2018) estableció que los compuestos que dan color son las quinonas. Las cuales al ser analizadas mediante FT-IR presentan picos de absorción en aproximadamente  $1600\text{ cm}^{-1}$ . Los solventes más utilizados fueron metanol, acetato de etilo y acetonitrilo. En la Tabla 4 se muestran extractos producidos por microorganismos identificados mediante FT-IR.

**Tabla 4.** Grupos funcionales de metabolitos secundarios fúngicos determinados mediante FT-IR, algunos con coloración roja.

| Número de onda $\text{cm}^{-1}$ | Grupo Funcional       | Microorganismo empleado | Compuesto identificado | Referencia                   |
|---------------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|------------------------------|
| 3310                            | O-H Alcohol           |                         |                        |                              |
| 1648                            | C=C Amina             |                         |                        |                              |
| 1625                            | C=C Alqueno           |                         |                        |                              |
| 1329                            | C-O Ácido carboxílico | <i>Acremonium sp.</i>   | Oosporeína             | Divekar <i>et al.</i> , 1959 |
| 1297                            | C-H Alqueno           |                         |                        |                              |
| 1242                            | C-O Alcohol           |                         |                        |                              |
| 1070                            | C-O Alcohol           |                         |                        |                              |
| 929                             | C-O Anhídros          |                         |                        |                              |

|         |   |  |  |                                  |
|---------|---|--|--|----------------------------------|
| 764     | C-H Aromáticos                              |  |  |                                  |
| 740     | C-H Aromáticos                              |  |  |                                  |
| 708     | C-H Alqueno                                 |  |  |                                  |
| 3300    | O-H Alcohol                                 |  |  |                                  |
| 1625    | Quelado/quinona                             | <i>Chaetomium trilaterale</i>                        | Oosporeína   | Cole <i>et al.</i> , 1974        |
| 1380    | -CH <sub>3</sub> Metil                      |  |  |                                  |
| 1613    | Quinona                                     | <i>Beauveria bassiana</i> (Nov-EO-1)                 | Oosporeína   | Eyal <i>et al.</i> , 1994        |
| 3292    | Hidroxilo                                   |  |  |                                  |
| 1648    | C=C Alqueno                                 |  |  |                                  |
| 3436    | N-H Amina                                   | <i>Monascus purpureus</i>                            | 9-(1-hydroxyhexyl)-3-(2-hydroxypropyl)-6a-methyl-9,9a-dihydrofuro [2,3-h]isoquinoline-6,8(2H,6aH)-dione (nuevo pigmento) | Mukherjee y Singh, 2011          |
| 2954    | C-H Alcano                                  |  |  |                                  |
| 1730    | Grupo carbonilo                             |  |  |                                  |
|         |   |  |  |                                  |
| 3308    | O-H Alcohol                                 | <i>Cochliobolus kusanoi</i>                          | Oosporeína   | Alurappa <i>et al.</i> , 2014    |
| 1648    | C=O Aminas                                  |  |  |                                  |
| 1624    | C=C Alqueno                                 |  |  |                                  |
| 1065    | C-OH; R-O-R Éster                           |  |  |                                  |
| 3420.94 | O-H Alcoholes o fenoles                     |  | Ácido 9,12-octadecadienoico  |                                  |
| 3002.58 | =C-H Estiramiento aromático                 |  |  |                                  |
| 2916.88 | C-H Alcanos                                 |  | Ácido <i>n</i> -hexadecanoico  |                                  |
| 2122.99 | -C≡C- Nitrilos aromáticos                   |  |  |                                  |
| 1654.84 | -C=C- Alcanos estirados                     |  | Ácido octadecanoico, fenil metil éster   | Ragavendran <i>et al.</i> , 2017 |
| 1436.22 | C-H Alcanos doblados                        | <i>Beauveria bassiana</i> ( <i>Clavicipitaceae</i> ) |  |                                  |
| 1409.89 | C-C Estiramiento aromático                  |  | 3,5-dinitrobenzoato de deshidroegosterol   |                                  |
| 1315.64 | C-O Alcoholes, ácidos carboxílicos, ésteres |  |  |                                  |
| 1021.42 | C-N Aminas alifáticas                       |  | Escualeno  |                                  |

|        |                                  |                                       |  |                                       |
|--------|----------------------------------|---------------------------------------|--|---------------------------------------|
| 953.59 | =C-H Alqueno de flexión          |                                       |  |                                       |
| 901.85 | N-H Amina primaria               |                                       |  |                                       |
| 706.10 | C-O Cetona                       |                                       |  |                                       |
| 810    | N-H Amina                        |                                       |  |                                       |
| 1065   | C-OH; R-O-R Éster                | <i>Beauveria bassiana</i> (Vuillemin) | Posiblemente sea Beauvericina Basianolida Oosporeína | Villegas-Mendoza <i>et al.</i> , 2019 |
| 1120   | C-N Amina                        |                                       |  |                                       |
| 1375   | C-H Metilo                       |                                       |  |                                       |
| 1530   | C=C Alqueno y/o anillo aromático |                                       |  |                                       |
| 1629   | C=C Alqueno                      |                                       |  |                                       |
| 2830   | CH <sub>3</sub> -O-R Metoxilo    |                                       |  |                                       |
| 2900   | C-H Ácido carboxílico            |                                       |  |                                       |
| 3000   | C-OH-H Carbono hidroxilo         |                                       |  |                                       |
| 3500   | N-H Amida                        |                                       |  |                                       |

### 3.2 Espectrometría de masas

Eyal *et al.*, (1994), emplearon *Beauveria bassiana* Nov-EO-1 para la producción de un extracto rojo, el cual fue identificado mediante espectrometría de masas. Obteniendo un ión en  $m/z$  de 307, mostrando que el peso molecular del compuesto fue de 306. Así como otros iones (324, 335 y 347) estableciendo que se debe al compuesto denominado oosporeína. Cole *et al.*, (1974) identificaron oosporeína empleando el hongo *Chaetomium trilaterale* en fermentación líquida con caldo micológico Difco suplementado con extracto de levadura al 2% p/v y 15% p/v de sacarosa, incubándose a 28°C durante 14 días. Obtuvieron 2.5 mg/L del compuesto. El análisis de espectrometría de masas mostró una masa molecular de  $m/z$  306.0368 con fórmula C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>O<sub>8</sub>. Strasser *et al.*, (2000a), identificaron metabolitos producidos por cepas de *Beauveria brongniartii*, en medio Sabouraud glucosa al 2% p/v, incubados a 23°C y 350-400 rpm durante 4 días a pH de 6. Los metabolitos fueron identificados mediante HPLC con un espectrómetro de masas de ionización por electrospray, detectando al compuesto oosporeína en modo de ionización negativa obteniendo un valor de  $m/z$  305 [M-H]<sup>-</sup>. Así como, las siguientes concentraciones del compuesto para cada cepa:

IMBST 95031 (0.03 g/L), IMBST 95041 (0.24 g/L) y W 4574 (0.09 g/L). Basyouni y Vining, (1966) extrajeron oosporeína de *Beauveria bassiana*, mediante fermentación líquida con: D-glucosa (20 g), neopeptona (20 g/L), glicina (5 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1 g/L), incubado a 25°C y 220 rpm durante 4 días. La concentración del compuesto obtenida estuvo entre 100 y 530 mg/L. En este trabajo, se tuvo como objetivo evaluar el efecto del medio de cultivo sobre la producción de pigmentos de *Beauveria bassiana* DS3.17 mediante fermentación líquida.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Los hongos entomopatógenos sintetizan una serie de compuestos denominados toxinas que afectan de manera significativa a otros organismos. Dichas toxinas son producto del metabolismo secundario, y tienen importancia en la industria biotecnológica. Específicamente, las especies de *Beauveria* son conocidas por producir una variedad de metabolitos secundarios que son biológicamente activos incluyendo pigmentos derivados de policétidos, oosporeína, bassianina y tenellina; y toxinas, beauvericina un péptido cíclico, que se encuentran implicadas en el mecanismo de acción del hongo, ya que se supone que tienen un papel importante en la patogénesis y virulencia de los hongos. El uso de las tecnologías analíticas (espectrometría de masas, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, etc.) y la optimización de procesos fermentativos ha propiciado el desarrollo de productos a base de hongos, para ser empleados en el control biológico. Permitiendo la caracterización química de compuestos aun en pequeñas cantidades, lo que brindaría una fuente potencial para su producción con especies nativas para posteriormente ser utilizados en prácticas con plagas endémicas favoreciendo el avance de la industria agrícola. Sin embargo, en la actualidad se presentan algunos problemas con los procesos de producción a nivel laboratorio, como el tipo de medio de cultivo empleado, los tiempos de fermentación, las técnicas de extracción y purificación de metabolitos que influyen de manera directa, retrasando la obtención de los productos, variando los rendimientos y costos de producción. Por lo que es importante conocer los factores y metodologías que afectan la producción de metabolitos secundarios fúngicos para su futura implementación en programas de control biológico de plagas que afectan cultivos regionales de importancia económica.

## 5. HIPÓTESIS

La composición del medio de cultivo tendrá un efecto positivo sobre la producción de pigmentos de *Beauveria bassiana* DS3.17 en fermentación líquida.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Principal

Evaluar el efecto del medio de cultivo sobre la producción de pigmentos de *Beauveria bassiana* DS3.17 mediante fermentación líquida.

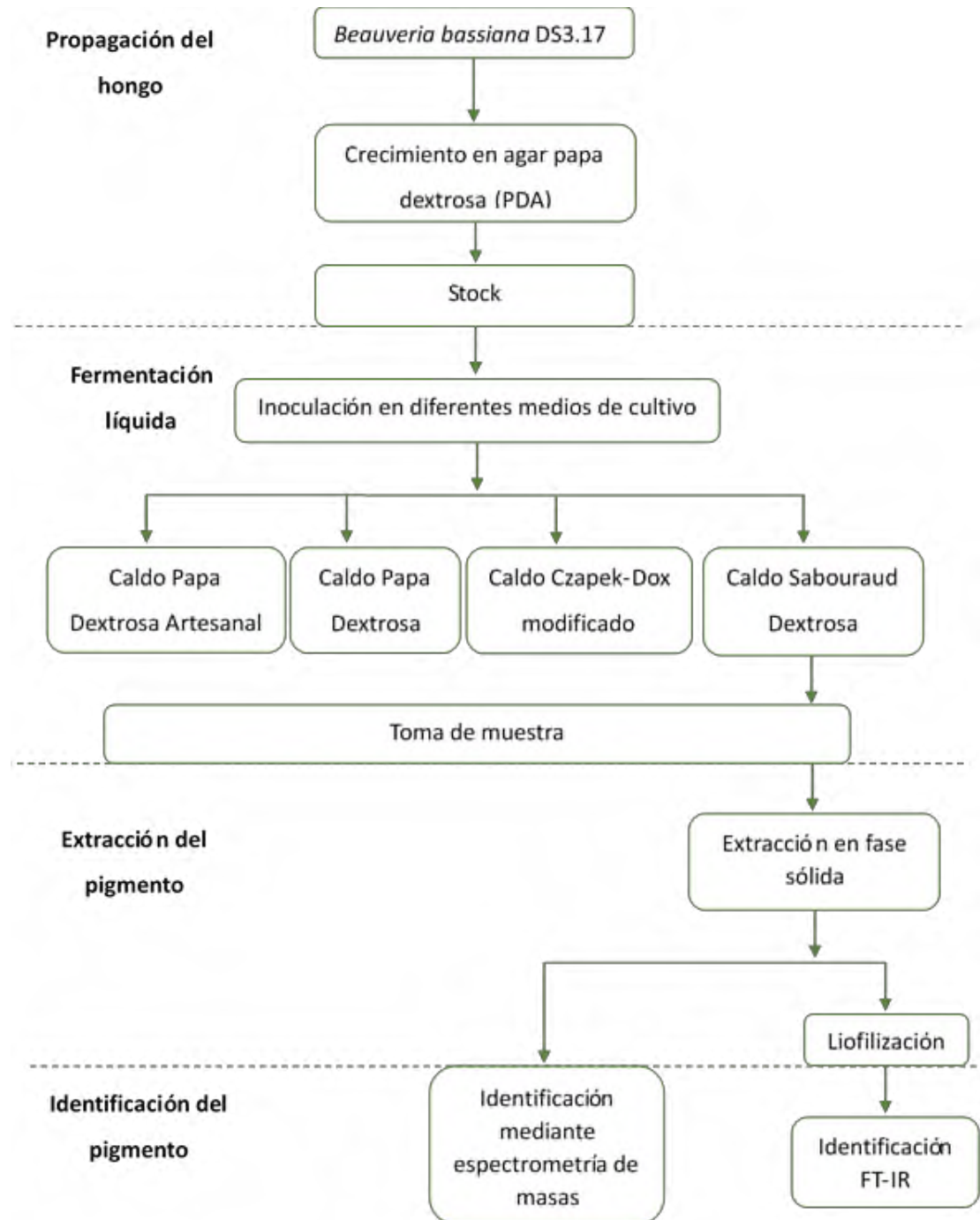
### 6.2 Secundarios

1. Seleccionar el medio de cultivo idóneo para la producción de pigmentos de *Beauveria bassiana* DS3.17 mediante fermentación líquida.
2. Establecer las condiciones de extracción de los pigmentos producidos.
3. Identificación de pigmentos producidos por *Beauveria bassiana* DS3.17.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Estrategia experimental

En el siguiente diagrama se muestra la metodología general empleada.



## 7.2 Microorganismo

Se empleó *Beauveria bassiana* DS3.17, perteneciente al cuerpo académico Biotecnología Sustentable de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, la cepa fue aislada de Rancho Grande (17.844256, -96.333192), Valle Nacional Oaxaca, México. Se reactivó en cajas Petri con agar papa dextrosa (PDA) al 4% (p/v) enriquecido con 0.05% extracto de levadura (EL) (p/v), se incubó durante 7 días a 25°C (Amin *et al.*, 2010). El stock se preparó raspando los conidios de la superficie de las cajas. Los conidios se suspendieron en 10 mL de agua destilada estéril, posteriormente se homogeneizaron en un vórtex (Thermo Fisher Scientific, USA) durante 15 segundos. Se hicieron diluciones seriales ajustándose las concentraciones a  $1 \times 10^8$  conidios/mL, las cuales se conservaron a 4°C (stock) con la finalidad de mantener la homogeneidad genética durante todo el estudio, con periodos de reactivación de 15 días (Núñez-Gaona, 2009).

## 7.3 Condiciones de cultivo

### 7.3.1 Preparación de Inóculo

La preparación del inóculo para la fermentación líquida consistió en agregar 1.5 mL de una suspensión de conidios con una concentración inicial de  $1 \times 10^8$  conidios/mL en matraces de 500 mL con 150 mL de caldo Sabouraud Dextrosa (SD) al 4% (p/v) enriquecido con 0.05% de extracto de levadura. Los matraces, se incubaron a 25°C con agitación orbital (180 rpm) (New Brunswick Scientific, modelo EXCELLA E24R), durante 3 días (Chaparro-Pedraza, 2010).

### 7.3.2 Fermentación Líquida

Se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer, con un volumen de 150 mL de cada uno de los medios. Caldo Dextrosa Sabouraud al 4% (p/v), suplementada con 0.05% (p/v) de extracto de levadura (Ragavendran *et al.*, 2017). Caldo papa dextrosa (Difco Dickinson, México) (Nagaoka *et al.*, 2004). Caldo papa dextrosa artesanal (Mao *et al.*, 2010). Caldo Czapek-Dox modificado, suplementado con 0.05% (p/v) de extracto de levadura (dos Reis Celestino *et al.*, 2014). Los matraces se inocularon con 1.5 mL de

una suspensión de conidios con una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/mL, posteriormente se incubaron en una incubadora con agitación orbital (New Brunswick Scientific Excella E24) a 25°C y 180 rpm durante 12 días (López-Sosa, 2018).

#### **7.3.2.1 Producción de conidios**

Cada 48 horas durante la fermentación se tomaron muestras, bajo condiciones asépticas, de los matraces (1mL), las cuales se homogenizaron en un vórtex (Thermo Fisher Scientific, USA) por 2 minutos. Se realizaron diluciones seriales  $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-3}$ . El conteo de conidios se realizó empleando una cámara de Neubauer con un microscopio óptico (Motic DM45C-F, México) y objetivo de 40X (Núñez-Gaona, 2009).

#### **7.3.2.2 Determinación de biomasa**

La biomasa, se cuantificó mediante peso seco, para cada muestra se colocaron 10 mL de caldo en tubos cónicos de 50 mL, se centrifugaron (Thermo Fisher Scientific Megafuge 16R, Alemania) durante 20 minutos a 5000 G y temperatura ambiente, posteriormente se filtró el micelio, utilizando papel filtro Whatman No. 2 previamente pesado, el papel filtro con el micelio se colocó en un horno (Scorpion Scientific) a 80°C durante 24 horas. Después de este tiempo los papeles filtro con la biomasa se colocaron en desecadores (Nalgene, Madrid España), hasta que alcanzaron la temperatura ambiente, posteriormente se pesaron. La concentración de biomasa se determinó como la diferencia entre el peso del papel filtro con biomasa menos el del papel solo (López-Courrau *et al.*, 2018). Al sobrenadante se le determinó el pH (Potenciómetro Hanna Instruments, USA).

#### **7.4 Producción aislamiento y caracterización parcial del pigmento**

*Beauveria bassiana* DS3.17 se inoculó en el medio que presentó la mayor pigmentación, se incubó bajo las condiciones descritas por 4 días (Strasser *et al.*, 2000a), posteriormente el caldo fermentado se centrifugó (Thermo Fisher Scientific Megafuge 16R, Alemania) a 5000 G a temperatura ambiente durante 20 min, con el objetivo de eliminar el micelio y los restos celulares. El sobrenadante se filtró con papel filtro Whatman No.2 modificando el método propuesto por Eyal *et al.*, (1994).

Una vez realizada la filtración se realizó el aislamiento del pigmento mediante el método de extracción en fase sólida (SPE).

#### **7.4.1 Extracción en fase sólida**

Se emplearon cartuchos con fase orgánica de octadecil C18 (Supel-Select HLB, 60 mg/3 mL) para la purificación del extracto. Se procesaron 300 mL del caldo fermentado de la siguiente manera: a 33 mL de caldo se le adicionaron 3 mL de acetonitrilo (MeCN) al 100% dejándose reposar hasta observar un precipitado, sucesivamente se activó el cartucho con 1 mL de MeCN al 100% a un flujo constante de aproximadamente 1 gota/min para garantizar una retención óptima. Después se realizó un acondicionamiento con 1 mL de MeCN al 5% (v/v), posteriormente, se cargaron 3 mL de muestra, aislando el pigmento con 1 mL de MeCN al 5% (v/v) y se eluyó con 1 mL de acetonitrilo al 30% (v/v) (Yilmaz *et al.*, 2016). Se colectó 1 mL de concentrado en microtubo (ependorf) de 1.5 mL (Merck, 2020) y se analizó por espectrometría de masas de alta resolución.

#### **7.4.2 Obtención de extractos**

La muestra concentrada se colectó modificando la metodología reportada por Mukherjee y Singh, (2011) en un matraz de bola, se retiró el disolvente mediante evaporación a presión reducida (Rotaevaporador Büchi R-300, Alemania) en baño María a 40°C entre 90 y 110 rpm, el concentrado obtenido se transfirió a tubos cónicos de 50 mL para ser liofilizado.

#### **7.4.3 Liofilización del concentrado**

Los concentrados se congelaron (-20°C) durante 8 horas, después de este tiempo las muestras se liofilizaron (Labconco FreeZone 4.5, USA) a una presión de 0.060 mBar y -53°C. Al finalizar, se colectó el liofilizado, se pesó (Adventurer Pro, AV114C, USA) y se almaceno a temperatura ambiente, modificando el método propuesto por (Carrión-Jara, 2010).

## 7.5 Identificación de metabolitos

### 7.5.1 Condiciones de operaciones de espectrómetro de masas

Se utilizó un espectrómetro de masas Synapt G2-Si (Waters) equipado con fuente de ionización por electronebulización, filtro de masas de cuadrupolo sencillo, celda de colisiones y analizador de masas de tiempo de vuelo. El análisis se hizo en modo ESI negativo con los siguientes parámetros: voltaje de capilar de 3 kV y temperatura de 120°C, se empleó N<sub>2</sub> como gas de desolvatación (800 L/h, 200°C) y 35 V como voltaje para el cono de muestra. Para la calibración se utilizó NaI (2 µg/µL), mientras que la corrección de masa exacta se llevó a cabo infundiendo continuamente el péptido de referencia leucina-encefalina (1ng/µL, 5 µL/min), monitoreando el ion 554.2615 (tiempo de adquisición: 0.5 segundos, cada 10 segundos). Los espectros fueron adquiridos en un intervalo de 50 a 1000 *m/z*, con una velocidad de adquisición de 0.5 segundos, en formato centroide. La manipulación del equipo, así como la adquisición y procesamiento de datos se realizó mediante el programa MassLynx V4.1 (Waters) se realizaron modificaciones en la metodología reportada por Mc Namara *et al.*, (2019).

### 7.5.2 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier

Se utilizó un equipo de espectroscopía infrarroja (Dynascan modelo Spectrum 100. Perkin Elmer, USA), el cual utilizó el software IR solution, empleándose la metodología de transformada de Fourier (FT-IR). 2 mg de muestra seca previamente liofilizada se analizaron a temperatura ambiente mediante un barrido espectral en un rango de 4000 a 515 cm<sup>-1</sup>. La resolución espectral se estableció a 4 cm<sup>-1</sup>, obteniéndose el espectro con 4 barridos (Mc Namara *et al.*, 2019).

## 7.6 Análisis estadístico

A los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05 empleando un software estadístico (Minitab).

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Fermentación líquida

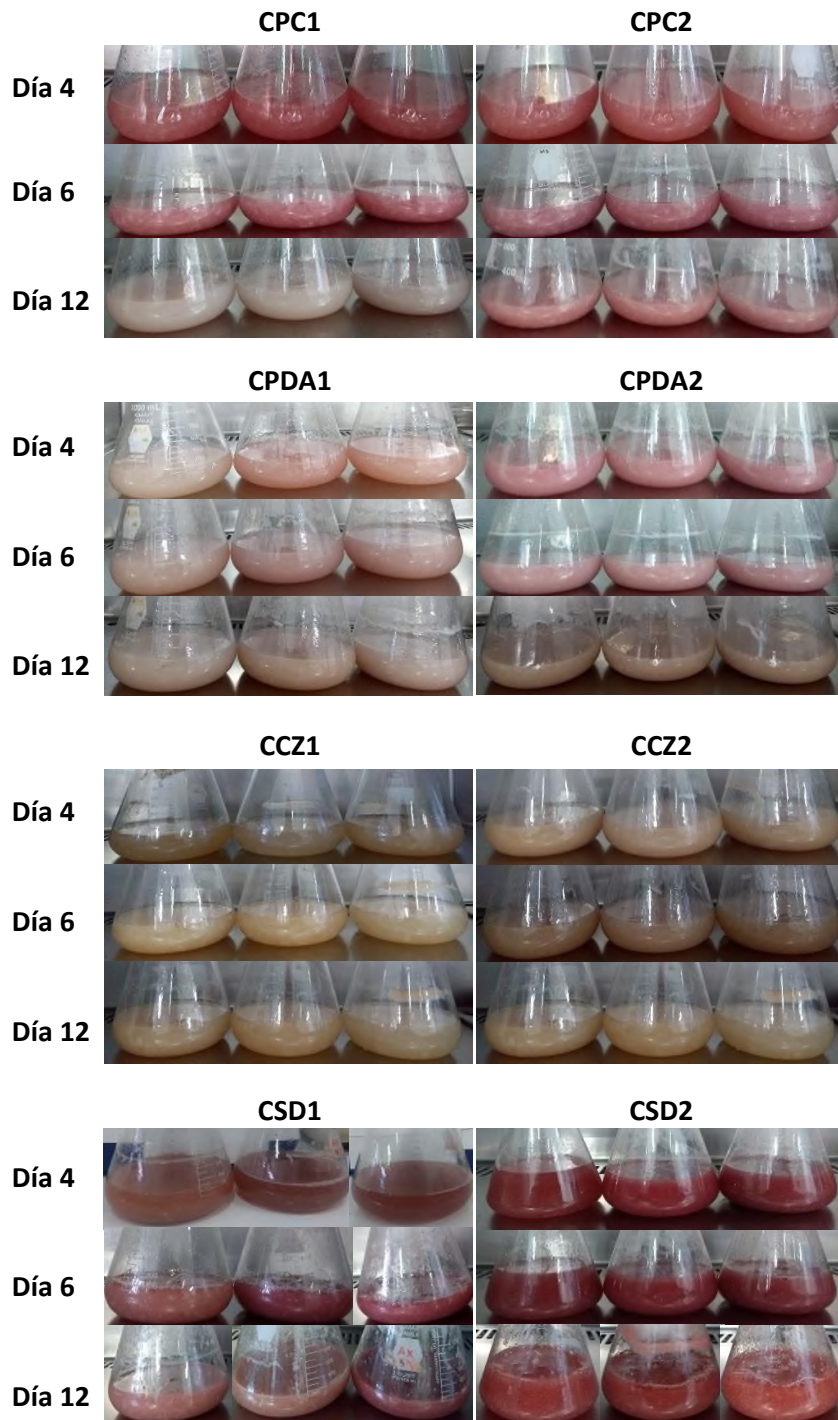
Después de 12 días de incubación, se observaron cambios en la pigmentación de algunas fermentaciones sumergidas. Se realizó un análisis cualitativo para presencia de pigmentos (Tabla 5), agrupándose de la siguiente manera: (-) ausente (+) poca intensidad, (++) intensidad moderada, (+++) buena intensidad y (++++) muy buena intensidad.

**Tabla 5.** Evaluación cualitativa de la presencia de pigmentos en las fermentaciones líquidas de *Beauveria bassiana* DS3.17.

| Medio  | Evaluación de la pigmentación |
|--|-------------------------------|
| CPC1 (Caldo Papa Comercial)                                    | +                             |
| CPC2 (Caldo Papa Comercial con extracto de levadura)           | ++                            |
| CPDA1 (Caldo Papa Dextrosa Artesanal)                          | +                             |
| CPDA2 (Caldo Papa Dextrosa Artesanal con extracto de levadura) | +                             |
| CCZ1 (Caldo Czapek-dox)  | -                             |
| CCZ2 (Caldo Czapek-dox con extracto de levadura)               | -                             |
| CSD1(Caldo Sabouraud Dextrosa)                                 | +++                           |
| CSD2 (Caldo Sabouraud Dextrosa con extracto de levadura)       | ++++                          |

(-) ausente (+) poca intensidad, (++) moderada intensidad, (+++) buena intensidad y (++++) muy buena intensidad.

De los medios de cultivo evaluados: Caldo papa dextrosa artesanal sin extracto de levadura (CPDA1), Caldo papa dextrosa artesanal con extracto de levadura (CPDA2), Caldo papa comercial sin extracto de levadura (CPC1), Caldo papa comercial con extracto de levadura (CPC2), Caldo Czapek-dox sin extracto de levadura (CCZ1), Caldo Czapek-dox con extracto de levadura (CCZ2), Caldo Sabouraud dextrosa sin extracto de levadura (CSD1) y Caldo Sabouraud dextrosa con extracto de levadura (CSD2), tres presentaron pigmentación (CPDA1, CPDA2, CPC1, CPC2, CSD1 y CSD2) a los cuatro días de fermentación como se muestra en la Figura 5.



**Figura 5.** Pigmentación en diferentes medios con fermentación líquida de *Beauveria bassiana* DS3.17. Caldo Papa Dextrosa Artesanal (CPDA1), Caldo Papa Dextrosa Artesanal con extracto de levadura (CPDA2), Caldo Papa Comercial (CPC1), Caldo Papa Comercial con extracto de levadura (CPC2), Caldo Czapek-dox (CCZ1), Caldo Czapek-dox con extracto de levadura (CCZ2), Caldo Sabouraud Dextrosa (CSD1) y Caldo Sabouraud Dextrosa con extracto de levadura (CSD2).

El color del caldo se oscureció con el tiempo, lo que se relacionó con su potencial para la producción de pigmentos, posteriormente, al día seis la pigmentación comenzó a disminuir en el medio caldo Papa dextrosa artesanal sin y con extracto de levadura (CPDA1, CPDA2), comparándolo con el medio Papa comercial el medio con extracto de levadura (CPC2) presentó pigmentación hasta el día doce. Lo anterior se puede atribuir a la composición del medio y al tipo de cepa. Contrario a Méndez-Zavala *et al.*, (2007) que obtuvieron pigmentación a los tres días y observaron una coloración roja más intensa a los ocho días de cultivo.

Sin embargo, no se alcanzaron niveles de producción apreciables para el medio Czapek-dox con y sin extracto de levadura (CCZ1, CCZ2), lo anterior se puede atribuir a la cepa hongo y a la relación de la cantidad de fuente de carbono y fuente de nitrógeno (FC:FN) utilizada. Obteniéndose relaciones para CSD1 y CSD2 de 4:1 y 4:1.05 respectivamente, que fue el medio con la concentración más alta de la fuente de nitrógeno. Para CPDA1 y CPDA2 fue 30:0 y 30:0.05, en medio CPC1 y CPC2 de 20:0 y 20:0.05, por último, para CCZ1 y CCZ2 de 30:1 y 30:0.05 respectivamente, siendo los medios CPDA y CCZ los que presentaron una relación más baja. Mata y Barquero (2010) obtuvieron un mejor crecimiento del hongo con FC:FN 2:1 (25 g/L de sacarosa, 4.17 g/L extracto de levadura y 8.33 g/L de peptona), así como concentraciones medias y altas de carbono (2:1 y 5:1) permitieron un mejor crecimiento. Vega *et al.*, (2003) evaluaron el rendimiento de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, mostrando que aislados de *B. bassiana* ATCC 74250 produjeron concentraciones más altas de esporas en comparación con cepas de *B. bassiana* ARSEF 5460 en todos los medios probados a distintas relaciones de C:N (50:1, 30:1, 10:1). Obtuvieron mayor rendimiento de la cepa con una relación 10:1, demostrando que los dos aislados de *Beauveria* mostraron patrones distintos de esporulación. Puede deberse a la efectividad de cada cepa y la afinidad por las fuentes de nutrientes que influyan en su crecimiento y producción de pigmentos.

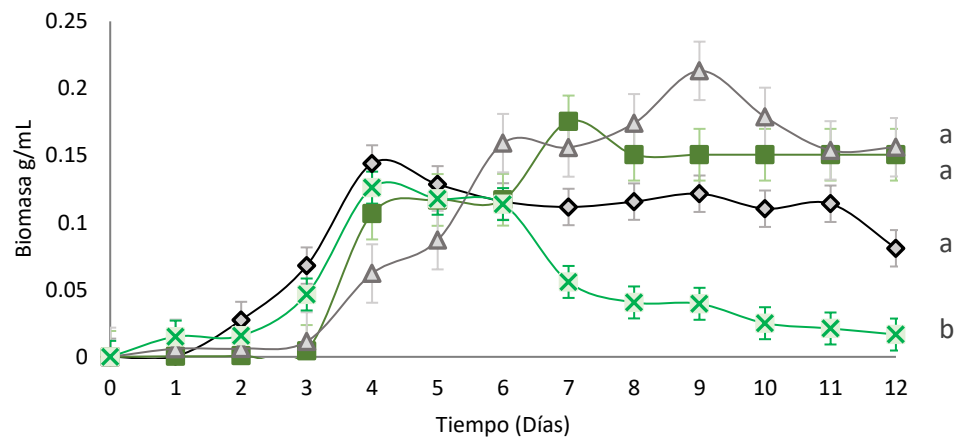
La imposibilidad para la producción del pigmento rojo en este tipo de medios puede ser atribuible a la especie de *Beauveria*, ya que otras especies sintetizaron pigmentos en una variedad de medios simples y complejos como *Monascus purpureus*,

*Chaetomium cupreum* y *Acremonium sp* respectivamente (Mukherjee y Singh, 2011; Mao *et al.*, 2010; Divekar *et al.*, 1959). El Basyouni *et al.*, (1968) reportaron que la producción de pigmentos (rojo para oosporeína y amarillo para bassianina) está relacionada con la presencia de una fuente de carbono como glucosa. La adición de suplementos de trazas de metales al medio Czapek-Dox indicó que la producción de oosporeína se redujo por el manganeso, pero aumentó por los iones de zinc.

En contraste, el medio Sabouraud con extracto de levadura (CSD2) mantuvo la coloración hasta el día doce de cultivo. Lo que podría deberse a un efecto precursor del extracto de levadura sobre el mantenimiento de la pigmentación. Por lo que se seleccionó como el medio más favorable para la producción de pigmentos. La capacidad que poseen las especies de *Beauveria* para la producción de pigmentos es influenciada por la composición del medio de cultivo y por la cepa empleada, ya que el género posee la capacidad de producir una serie de metabolitos secundarios (pigmentos): rojos, naranjas y amarillos (El Basyouni *et al.*, 1968; Strasser *et al.*, 2000a; Amin *et al.*, 2010), mediante procesos fermentativos (El Basyouni y Vining, 1966).

### 8.1.2 Producción de biomasa

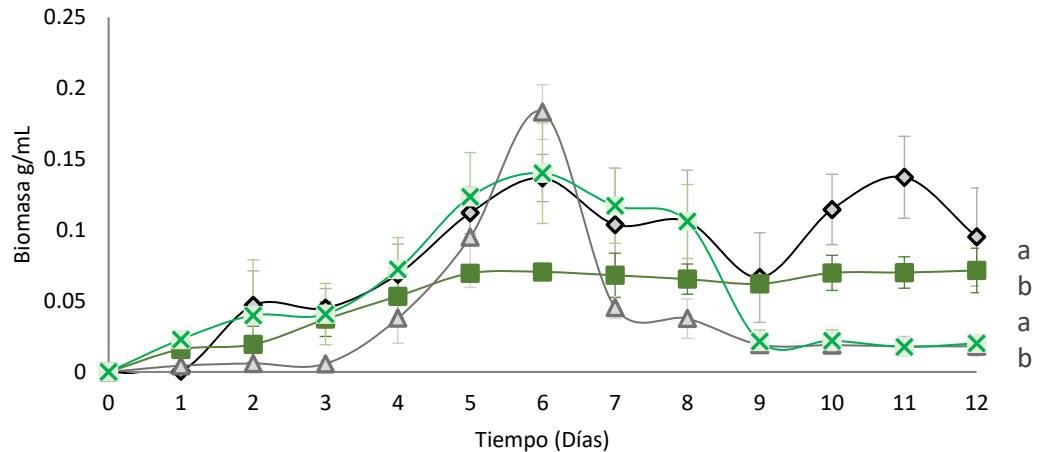
En la Figura 6 se muestra producción de biomasa en medios sin extracto de levadura, se observó que la fase de latencia para medios Papa artesanal y Papa comercial culminaron a los dos días iniciando la fase de crecimiento exponencial entre el día tres y cuatro, posteriormente lo concentración de biomasa fúngica se mantuvo constante entre los días cuatro y seis (CPDA1), seis y ocho (CPC1) respectivamente. Se alcanzó la mayor concentración de biomasa, para Papa artesanal se obtuvo en el día 7 (0.17 g/mL) y para medio Papa comercial (0.21 g/mL) en el día 9.



**Figura 6.** Producción de biomasa de *Beauveria bassiana* DS3.17 en fermentación líquida con medios sin extracto de levadura: Caldo Sabouraud Dextrosa (CSD1) (◊), Caldo Papa Artesanal (CPDA1) (■), Caldo Papa Comercial (CPC1) (▲) y Caldo Czapek-dox (CCZ1) (X). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los medios, con un nivel de confianza del 95%.

Sin embargo, para los medios Sabouraud (CSD1) y Czapek-dox (CCZ1) la mayor producción se obtuvo en el día cuatro, 0.14 g/mL y 0.12 g/mL respectivamente, el medio Czapek-dox presentó un descenso en el día siete. Conforme transcurrieron los días las fermentaciones presentaron pellets más pequeños. Los resultados obtenidos presentaron diferencias con lo reportado por Amin *et al.*, (2010), quienes obtuvieron un valor máximo de 5.4 g/L para el día 5; por otro lado, Strasser *et al.*, (2000a) reportaron una concentración de biomasa de 7 g/L para el cuarto día con *Beauveria brongniartii*.

En la Figura 7 se muestra el comportamiento de la biomasa obtenida en medios con extracto de levadura, realizándose un análisis ANOVA de un factor en el que se analizó la producción de biomasa con respecto a los medios sin extracto de levadura con un nivel de significancia del 0.05% , para el caldo de Papa comercial (CPC2) que la máxima concentración de biomasa (0.18 g/mL), se alcanzó al sexto día, al igual que para los medios Sabouraud dextrosa (CSD2) (0.13 g/mL) y caldo Czapek-dox (CCZ2) (0.14 g/mL). Por otro lado, el caldo de Papa artesanal (CPA2) mostró un incremento hasta el día 5 manteniéndose constante hasta el final de la fermentación con una concentración máxima de 0.07 g/mL. Se ha empleado una variedad de medios para la producción de micelio, con dextrosa como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de compuestos nitrogenados (Mata y Barquero 2010; Eyal *et al.*, 1994). Dentro de las alternativas para mejorar los rendimientos de metabolitos, biomasa y enzimas, se encuentra el extracto de levadura (Bautista *et al.*, 2018). Es un factor regulador que influye en la producción de pigmento, ya que aporta vitaminas, aminoácidos y coenzimas necesarias para el crecimiento del hongo, que se pueden emplear en la biosíntesis del pigmento. Las curvas de biomasa de los medios CSD2, CPDA2 y CCZ2 presentaron un comportamiento diaúxico con una primera fase de crecimiento exponencial en los primeros cuatro días de fermentación y una segunda fase exponencial a los 6 y 11 días, el comportamiento podría estar relacionado con el tipo de medio de cultivo y su capacidad para producir pigmentos.

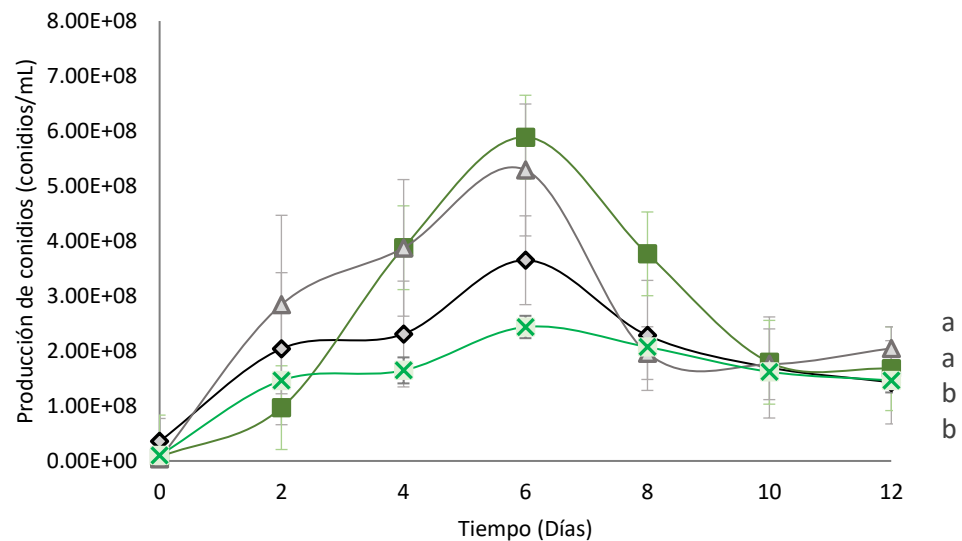


**Figura 7.** Producción de biomasa por *Beauveria bassiana* DS3.17 en fermentación líquida con extracto de levadura en medios: Caldo Sabouraud Dextrosa (CSD2) (◇), Caldo Papa Artesanal (CPDA2) (■), Caldo Papa Comercial (CPC2) (△) y Caldo Czapek-dox (CC22) (X). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los medios, con un nivel de confianza del 95%.

Amin *et al.*, 2010 establecen que la producción de pigmento rojo comenzó en el día 4 de la fermentación, seguido de la producción de biomasa mostrando un mayor crecimiento en el día 5, siendo lineal en contraste con la producción de pigmento. La producción de oosporeína puede estar relacionado con la disponibilidad de nutrientes y biomasa fúngica (Strasser *et al.*, 2000a), así como también dependiendo de la especie fúngica; las fuentes de carbono y nitrógeno se asimilarán de diferente manera modificando los rendimientos de pigmentos (dos Reis Celestino *et al.*, 2014). *Beauveria bassiana* DS3.17 es una cepa recientemente aislada de su habitat natural por lo que no ha sido adaptada para su propagación en los medios de cultivo evaluados, por lo tanto, se puede considerar este trabajo como un estudio preliminar para evaluar el crecimiento y producción de metabolitos secundarios de *Beauveria*. Debido a la intensidad de la coloración roja presentada en el medio Sabouraud dextrosa con extracto de levadura (CSD2), se seleccionó este medio para la producción del pigmento.

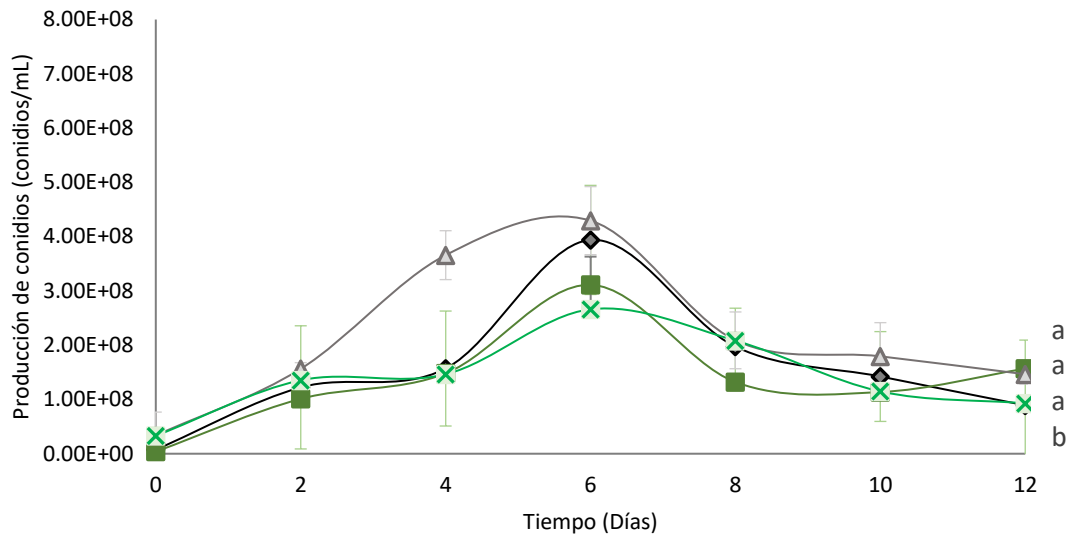
### 8.1.3 Producción de conidios

En la Figura 8 se muestra la producción de conidios en los distintos medios sin extracto de levadura, y en la Figura 9 con extracto. Se observó que todos los medios presentaron la mayor producción en el día 6, siendo el medio caldo Papa dextrosa artesanal sin extracto (CPDA1) con el que se obtuvo la mayor producción con  $5.89 \times 10^8$  conidios/mL y el caldo Czapek-dox (CCZ1) presentó la menor concentración ( $2.44 \times 10^8$  conidios/mL).



**Figura 8.** Producción de conidios de *Beauveria bassiana* DS3.17 en fermentación líquida sin extracto de levadura, medios: Caldo Sabouraud Dextrosa (CSD1) (◆), Caldo Papa Artesanal (CPDA1) (■), Caldo Papa Comercial (CPC1) (▲) y Caldo Czapek-dox (CCZ1) (X). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los medios, con un nivel de confianza del 95%.

En cuanto a los medios con extracto de levadura, el caldo de Papa comercial fue el que presentó las mayores concentraciones con  $4.29 \times 10^8$  conidios/mL y el valor más pequeño ( $2.66 \times 10^8$  conidios/mL) correspondió a Czapek-dox. Estas diferencias se atribuyeron a la composición de los medios de cultivo.



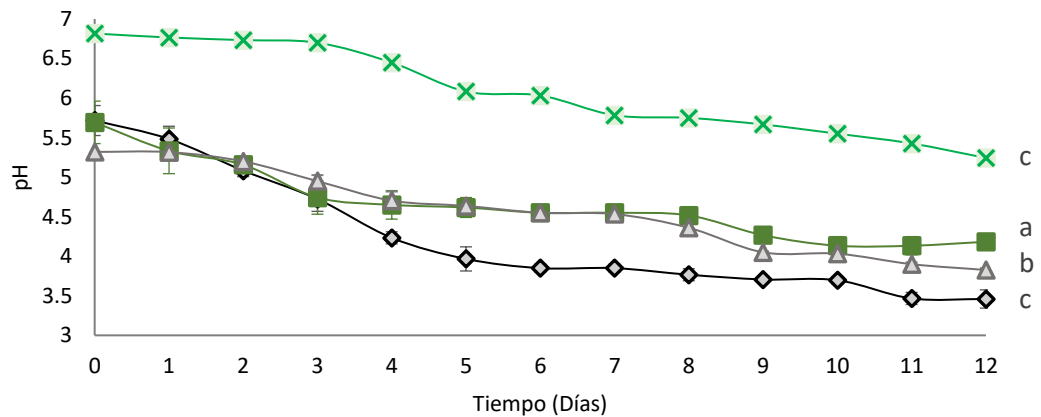
**Figura 9.** Producción de conidios de *Beauveria bassiana* DS3.17 en fermentación líquida con extracto de levadura, medios: Caldo Sabouraud Dextrosa (CSD2) (◆), Caldo Papa Artesanal (CPDA2) (■), Caldo Papa Comercial (CPC2) (▲) y Caldo Czapek-dox (CCZ2) (×). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los medios, con un nivel de confianza del 95%.

El análisis estadístico mostró que para la producción de conidios de *Beauveria bassiana* DS3.17, existen diferencias significativas ( $\alpha$ : 0.05) entre los medios con y sin extracto de levadura. Así mismo Mata y Barquero (2010) también evaluaron la influencia del medio de cultivo con diferentes relaciones de FC:FN con *Beauveria bassiana* reportando que el crecimiento y la esporulación se vieron influenciados de manera positiva por la composición alta de carbono en el medio de cultivo. Presentando mayor crecimiento en los medios con cantidades de carbono elevadas (25-50 g/L), ya que a bajas concentraciones (12.5 g/L) hubo menor producción. A su vez la evaluación del último día de cultivo mostró que la proliferación fue mejor en los tratamientos donde se usó como fuente de nitrógeno extracto de levadura y cebada molida ( $2.77 \times 10^8$  esporas/ml y  $1.96 \times 10^8$  esporas/ml) respectivamente.

#### 8.1.4 Evolución del pH durante las fermentaciones

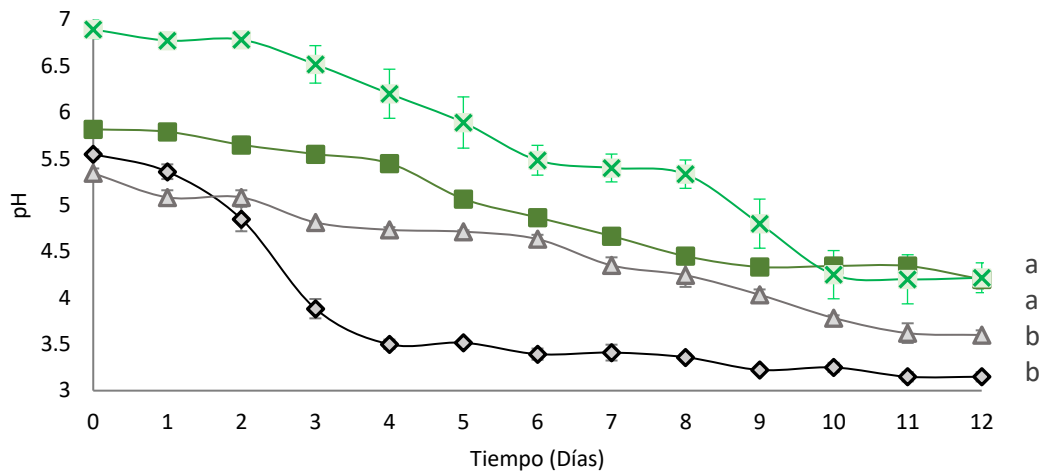
En la Figura 10 se muestra el comportamiento del pH para los medios sin extracto de levadura. Se observó un comportamiento similar para todos los medios, excepto para

Sabouraud dextrosa los medios de Papa (CPDA1, CPC1) mostraron valores finales de 4.18 y 3.82, respectivamente. Con el medio Sabouraud dextrosa (CSD1) se observó valor de pH final más ácido (3.46).



**Figura 10.** Evolución del pH en los medios de cultivo: Caldo Sabouraud Dextrosa (CSD1) (◆), Caldo Papa Artesanal (CPDA1) (■), Caldo Papa Comercial (CPC1) (▲) y Caldo Czapek-dox (CCZ1) (×) sin extracto de levadura con *Beauveria bassiana* DS3.17. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los medios, con un nivel de confianza del 95%.

Para los medios con extracto de levadura se observó (Figura 11), que las fermentaciones con CSD2 y CPC2 presentaron valores cercanos (3.15 y 3.6 respectivamente) así como CPDA2 y CCZ2 (4.2 y 4.21). Siendo el medio CSD2 el que presentó menor pH pudiéndose deber a la composición con peptona y extracto de levadura como fuente de nitrógeno, influyendo en el aumento de la pigmentación en el día 4. Luo *et al.*, (2015) reportan que la producción de oosporeína puede estar relacionado con factores de transcripción que regulan procesos que enlace metabolismo y resistencia al estrés, establecieron que el homólogo *msn2* contribuye al crecimiento de *Beauveria bassiana* y actúa como un regulador negativo dependiente del pH y de la producción de oosporeína. Lo que en nuestro caso puede deberse específicamente a nuestra nueva cepa y su capacidad para regular el pH del medio.



**Figura 11.** Evolución del pH en los medios con extracto de levadura: Caldo Sabouraud Dextrosa (CSD2) (◇), Caldo Papa Artesanal (CPDA2) (■), Caldo Papa Comercial (CPC2) (△) y Caldo Czapek-dox (CCZ2) (X) de *Beauveria bassiana* DS3.17. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los medios, con un nivel de confianza del 95%.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas ( $\alpha$  0.05) entre los medios con y sin extracto de levadura, para la evolución del pH durante el crecimiento de *Beauveria bassiana* DS3.17. El crecimiento óptimo de hongos entomopatógenos puede llevarse a cabo en un rango amplio de pH. Jackson *et al.*, (2004) observaron que *Paecilomyces fumosoroseus* reduce naturalmente el pH del medio durante la producción de blastosporas. Observaron que los cultivos con un valor de pH inicial de 6.5 terminaron con una reducción significativa (4.3). El crecimiento del hongo en valores reducidos de pH favoreció su competitividad sobre las bacterias contaminantes normales.

Wang *et al.*, 2004 establecieron que los rendimientos de destruxinas A, B y E producidas por cepas de *Metarhizium anisopliae*, se incrementaron al aumentar el contenido de peptona en el medio, también, observaron un descenso en el pH del medio. Al igual que Asaff-Torres (2006) estableció que la composición del medio de cultivo y las condiciones de operación, influyen en la producción de metabolitos (DPA y OXA) y pigmentos en cultivos de *Paecilomyces fumosoroseus*.

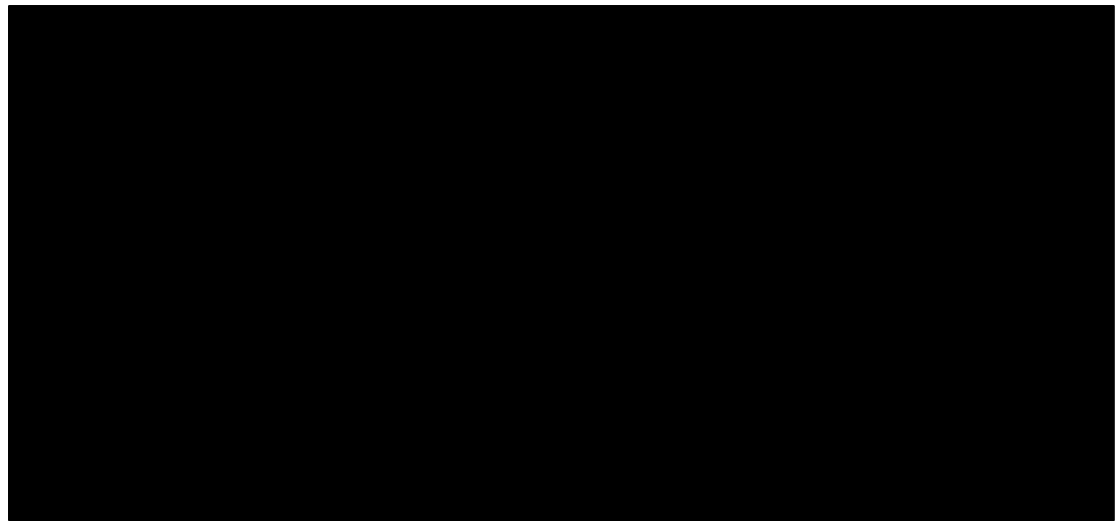
El análisis estadístico mostró diferencias significativas ( $\alpha$  0.05) entre los medios con y sin extracto de levadura, para la producción de biomasa el medio Czapek-dox (CCZ1 y

CCZ2) mostró diferencias con el resto de los medios (CPC1, CPC2, CSD1, CSD2, CPDA1, CPDA2), para conidios los medios de Papa (CPC1, CPC2, CPDA1, CPDA2) mostraron diferencias en comparación con Sabouraud y Czapek-dox (CSD1, CSD2, CCZ1, CCZ2). El pH mostró diferencias en todos los medios evaluados con *Beauveria bassiana* DS3.17, con base a los resultados mostrados, se vio favorecida la pigmentación en medio Sabouraud con extracto de levadura, por lo que fue seleccionado como medio de producción para la extracción.

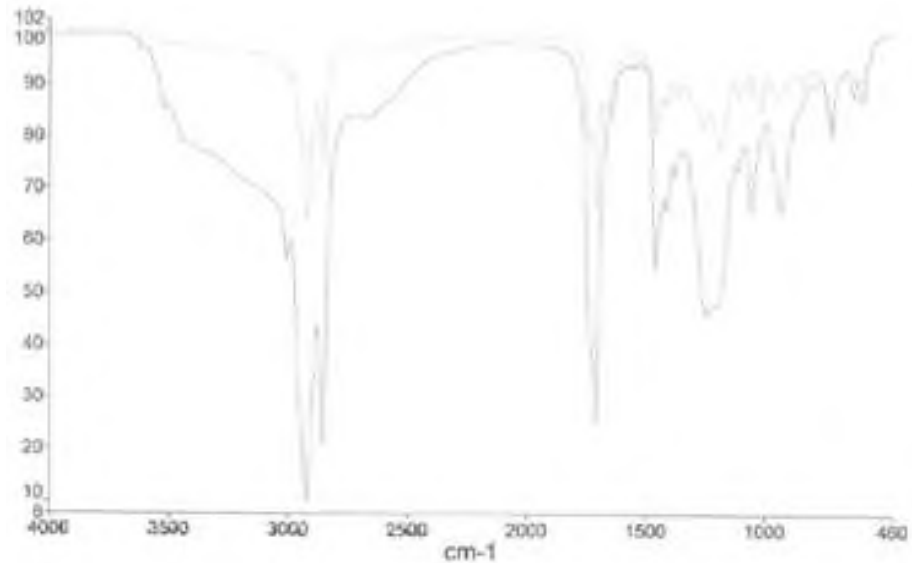
En los microorganismos la producción de diversos metabolitos secundarios es frecuentemente regulada por fuentes de carbono, cuando hay más de una presente en el medio. Por lo que la célula cataboliza la que es más fácil de procesar como la glucosa, mientras que la síntesis de algunas enzimas necesarias para la utilización de distintos sustratos es reprimida hasta que el primer sustrato se haya agotado (Sánchez y Demian 2002). En el presente trabajo los distintos medios (Anexo) empleados tuvieron influencia en la producción de pigmentos con la adición de extracto de levadura, junto con el tipo de fuente de carbono. En el medio Czapeck-dox a pesar de contener una baja concentración en sales no se vio favorecida la producción de pigmentos, aún adicionando una cantidad moderada de dextrosa (30 g/L) como fuente de carbono, a diferencia de los medios con papa y extracto de levadura tuvieron pigmentaciones más intensas que los medios sin extracto, sin embargo, en caldo Sabouraud con extracto tuvo mayor pigmentación pudiéndose deber a la peptona ya que otros autores la adicionaron en sus fermentaciones obteniendo en sus extractos tonalidades rojas. Aun no se han realizado procesos de optimización de la cepa DS3.17 que pudiera ser la razón por la que los metabolitos secundarios se presenten en el medio que la cepa es más afín. Así como el alto contenido de nitrógeno en el medio Sabouraud dextrosa creó un balance para que en este medio ocurriera la mayor pigmentación. Cuando se utilizó extracto de levadura como fuente de nitrógeno, se lograron apreciar pigmentaciones más intensas.

## 8.2 Identificación analítica del pigmento rojo de *Beauveria bassiana* DS3.17

Los resultados de FT-IR (Figura 12) indicaron que el extracto rojo pulverizado mostró la presencia de bandas de absorción en  $3276.88\text{ cm}^{-1}$  (OH),  $2926.96\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_3$ ),  $1631.41\text{ cm}^{-1}$  (alqueno y/o carbonilo),  $1520.60\text{ cm}^{-1}$  (alquenos y/o aromáticos),  $1449.78\text{ cm}^{-1}$  (alcano),  $1236.50$  (éster) y  $1039.04\text{ cm}^{-1}$  (amina). Las extracciones arrastraron diferentes metabolitos secundarios que resultaron ser de diferentes polaridades. El análisis de los espectros IR mostró la posibilidad de que en el extracto se encuentren compuestos como oosporeína, bassianina y tenellina (Villegas-Mendoza *et al.*, 2019) como se muestra en la Figura 13.

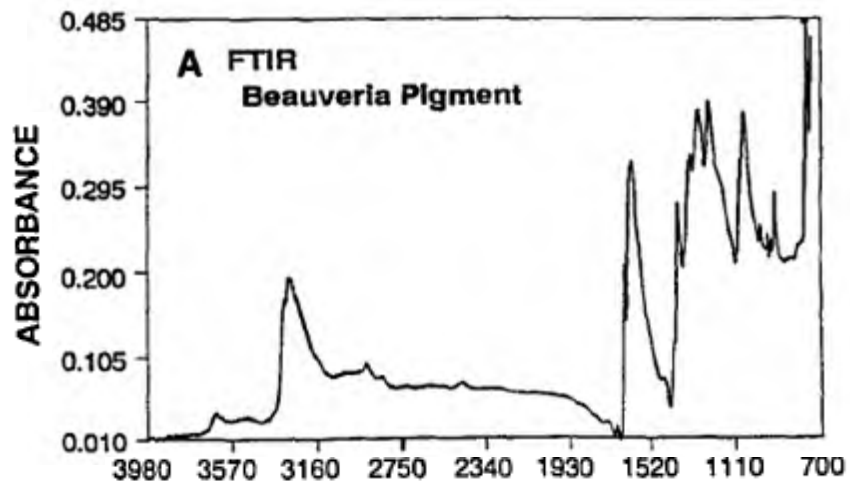


**Figura 12.** Espectro infrarrojo FT-IR del pigmento rojo de *Beauveria bassiana* DS3.17, extraído a los cuatro días de fermentación.



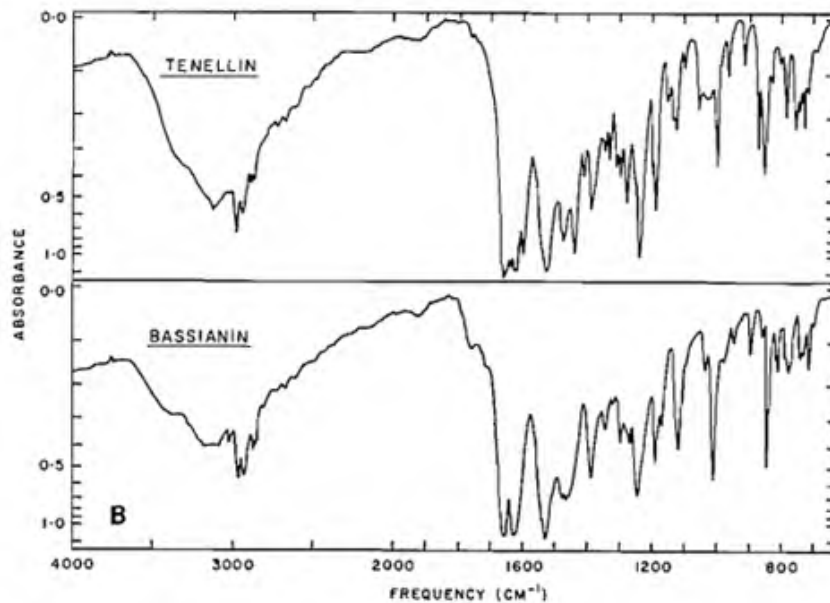
**Figura 13.** Espectro infrarrojo de extracto metanólico de *Beauveria bassiana* 1149, indicando la posibilidad de que sean compuestos como beauvericina, basianolida y/o oosporeína (Villegas-Mendoza *et al.*, 2019).

Los grupos funcionales presentes: carbonilo, hidroxilo y alqueno concuerdan con lo reportado por Eyal *et al.*, (1994) quienes reportaron la presencia de oosporeína, como se muestra en la Figura 14.



**Figura 14.** Espectro de absorción FT-IR del pigmento rojo oosporeína producido por *Beauveria bassiana* Nov. EO-1 con bandas de absorción a 1613, 3292 y 1648  $\text{cm}^{-1}$ , obtenido a los 7 días de fermentación (Eyal *et al.*, 1994).

Otros autores El Basyouni *et al.*, (1968), identificaron mediante análisis infrarrojo metabolitos secundarios tenellina y bassianina a partir de fermentación sumergida de *Beauveria tenella* y *Beauveria bassiana* obtuvieron bandas de absorción para tenellina a 3110, 1645, 1625 y 1615  $\text{cm}^{-1}$ , para bassianina 3100, 1655 y 1625  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 15).



**Figura 15.** Espectros infrarrojos de tenellina y bassianina obtenidos por *Beauveria bassiana* y *Beauveria tenella* extraídos a los 14 días de cultivo (El Basyouni *et al.*, 1968).

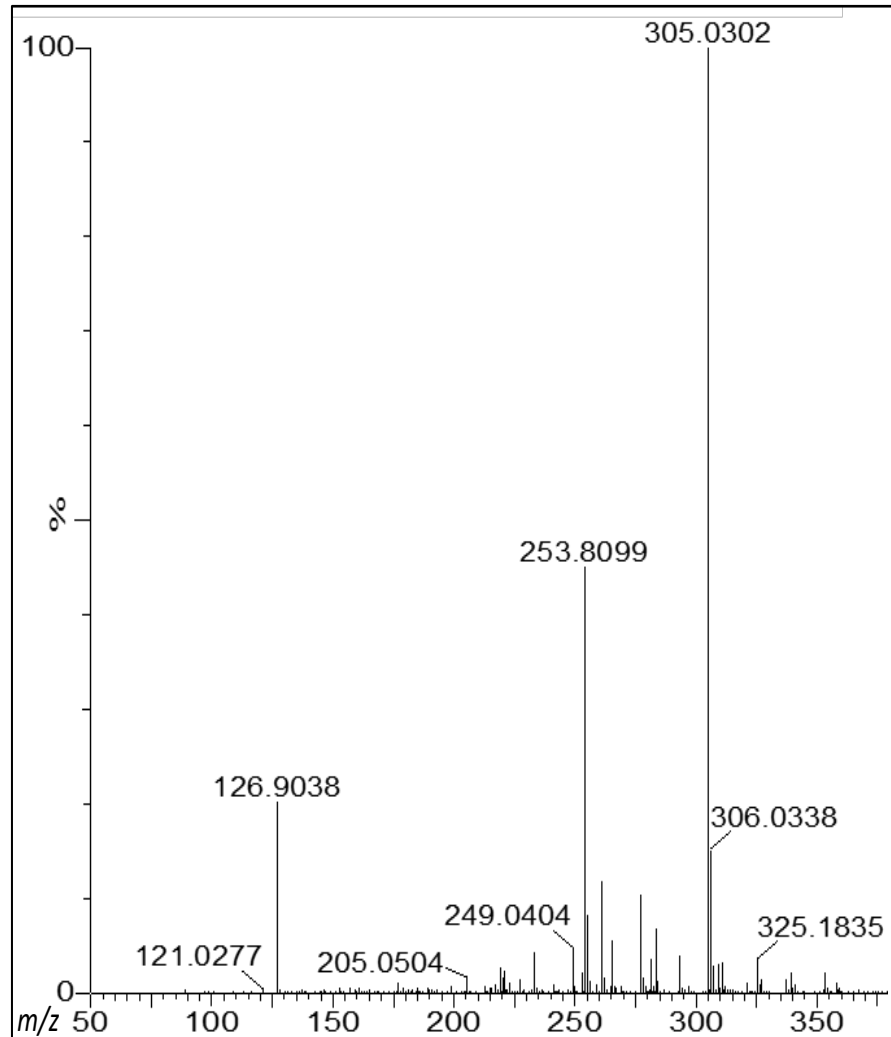
Así como, Cole *et al.*, (1974) quienes mostraron que extractos de color rojo con bandas en  $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$  indicaron la presencia de restos de quinonas que podrían pertenecer a oosporeína. Los grupos funcionales carbonilo C=O descritos para quinonas coincidieron con los obtenidos mediante fermentación líquida para una coloración rojiza con *Penicillium mallochii* (Rosas-Ramos, 2018). A continuación, se muestran en la Tabla 6 los grupos funcionales encontrados en el extracto rojo producido por *Beauveria bassiana* DS3.17.

**Tabla 6.** Grupos funcionales detectados mediante espectroscopía de infrarrojo en el pigmento rojo producido por *Beauveria bassiana* DS3.17.

| Número de onda (cm <sup>-1</sup> ) | Estructura química | Grupo funcional              |
|------------------------------------|--------------------|------------------------------|
| 3276.88                            | O-H; N-H           | Alcohol; amina               |
| 2926.96                            | C-H <sub>3</sub>   | Alcano                       |
| 1631.41                            | C=C; C=O           | Alqueno y/o carbonilo        |
| 1520.60                            | C=C                | Alqueno y/o anillo aromático |
| 1449.78                            | C=C                | Alcano                       |
| 1236.50                            | C-OH; R-O-R        | Éster                        |
| 1039.04                            | C-N                | Amina                        |

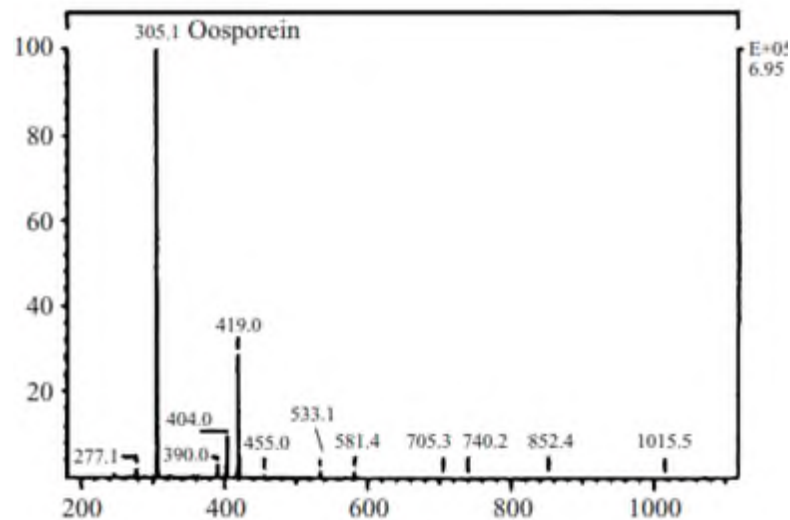
### 8.3 Análisis mediante espectrometría de masas del extracto obtenido

El pigmento rojo purificado obtenido de *Beauveria bassiana* DS3.17, se analizó mediante espectrometría de masas de alta resolución. La Figura 16 muestra el espectro de masas del pigmento, adquirido en el modo de ionización negativa (ESI). El ion en  $m/z$  305.0302 se debe al de la molécula desprotonada  $[M-H]^-$ , lo que sugiere con la fórmula molecular  $C_{14}H_9O_8$  que el peso molecular del compuesto principal es 306. La presencia de dicho ión confirmó un peso molecular de 306.0368 que es similar al de la oosporeína (Cole *et al.*, 1974; Eyal *et al.*, 1994, Nagaoka *et al.*, 2004; Strasser *et al.*, 2000a). La fórmula molecular coincide con la oosporeína.



**Figura 16.** Espectro de masas de alta resolución utilizando fuente de ionización por electronebulización (ESI) en modo negativo del pigmento rojo producido por *Beauveria bassiana* DS3.17 cultivado durante 4 días.

Como se muestra en la Figura 17, de acuerdo al espectro obtenido por Strasser *et al.*, (2000a) mediante HPLC conectado a un espectrómetro de masas de ionización por electronebulización (ESI-MS) en modo negativo, identificado como oosporeína que obtuvieron un pico superior con valor de  $m/z$  305.1, siendo comparado con el espectro del extracto de *Beauveria bassiana* DS3.17 un pico base de  $m/z$  305.03 (ión negativo), comprobando que ambos espectros correspondieron a la misma molécula.



**Figura 17.** Análisis por HPLC-MS del metabolito secundario identificado como oosporeína, obtenido del extracto de cultivo de *Beauveria brongniartii* (IMBST 95041) cultivado en reactor de tanque agitado durante 4 días (Strasser *et al.*, 2000a).

Mientras que el resto de picos presentaron valores  $m/z$  de 126.90, 253.80 y 325.18, atribuibles a otros residuos presentes en el medio, o a un aducto. Los valores  $m/z$  reportados para tenellina, bassianina y beauvericina son: 395.4, 369.4 y 784.4 respectivamente. Dichos valores no se muestran en la Figura 16.

Autores (Strasser *et al.*, 2000a; Eyal *et al.*, 1994) han descrito la presencia de pigmentos rojos en diferentes medios de cultivo específicamente producidos por el género *Beauveria*. De acuerdo a las características físicas y químicas del pigmento obtenido se puede concluir que se trata de oosporeína, debido a que ninguno de los otros metabolitos (bassianina, tenellina) producidos normalmente por especies de *Beauveria* coincidieron con las masas obtenidas en espectrometría de masas. De los resultados obtenidos en este estudio se establecería que dicho pigmento rojo podría aislarse e identificarse (grupos funcionales) de *Beauveria bassiana* DS3.17 empleando fermentación líquida. Sin embargo, se requieren análisis adicionales para su identificación completa como análisis mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), que brindará una estructura del compuesto y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para la cuantificación del metabolito obtenido. La oosporeína es un importante metabolito fúngico (dibenzoquinona)

detectado en extractos del género *Beauveria*, exhibe actividades antimicrobianas e insecticidas que pueden ser empleadas en el control biológico para combatir plagas endémicas de la región del Papaloapan, además este hongo tiene la propiedad de producir pigmentos que puede ser una alternativa como colorante natural y podría ser aplicado a nivel industrial como colorante.

#### **8.4 Rendimiento del pigmento**

A partir de la extracción de 300 mL de fermentación líquida se obtuvieron 40 mL de concentrado, fueron correspondientes con 26.52 mg/L este valor fue menor a 125 mg/L reportado por Nagaoka *et al.*, (2004) y a lo observado por El Basyouni y Vining (1966) con valores que oscilaron entre 100 y 530 mg/L, así como Basyouni *et al.*, 1968 mostró valores superiores de 146 mg/L, 100 mg/L y 60 mg/L. Estas bajas concentraciones se pueden atribuir a la falta de optimización del medio de cultivo, las condiciones de fermentación, así como al proceso de extracción (Strasser *et al.*, 2000a). Por lo que es necesario optimizar las condiciones de fermentación para alcanzar altos rendimientos de pigmento.

## 9. CONCLUSIONES

- La fermentación líquida con distintos medios de cultivo con y sin extracto de levadura mostró diferencias significativas en cuanto a la producción de biomasa, conidios y pigmento. Obteniendo una mayor concentración de 0.18 g/mL con extracto y 0.21 g/mL sin extracto de biomasa para el medio Papa comercial. Sin embargo, el medio Sabouraud dextrosa con extracto de levadura presentó la mayor pigmentación y el pH más ácido en el cuarto día de fermentación, haciéndolo idóneo para la producción y posterior extracción del pigmento.
- De los resultados presentados se pueden concluir que el medio Sabouraud con extracto de levadura es un medio idóneo para la producción de pigmentos por fermentación líquida.
- Las fuentes de carbono y nitrógeno influyen positivamente en la producción de pigmento y crecimiento de la cepa *Beauveria bassiana* DS3.17.
- El análisis infrarrojo indicó que en el extracto rojo obtenido se mostraron picos con grupos: OH, CH<sub>3</sub>, C=C, C=O, C-OH los cuales se correspondieron con algún metabolito secundario, oosporeína, bassianina o tenellina.
- El análisis del extracto mediante espectrometría de masas presentó un ion en  $m/z$  305.0302 que se debe al de la molécula desprotonada  $[M-H]^-$ , lo que indicó con la fórmula molecular C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>O<sub>8</sub> que el peso molecular del compuesto principal es 306  $m/z$ . La presencia de dicho ión confirmó un peso molecular de 306.0302, correspondiente con la fórmula molecular C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>O<sub>8</sub> coincidiendo con la oosporeína.

## 10. PERSPECTIVAS

- Realizar una caracterización química completa del pigmento purificado.
- Estudiar la actividad antimicrobiana del pigmento purificado.
- Optimizar las condiciones de producción del pigmento en fermentación líquida.
- Optimizar el proceso y garantizar la producción de otros colorantes para su posterior caracterización, además de aumentar rendimientos para disminuir costos de producción.
- Realizar bioensayos con el pigmento purificado.
- Realizar una caracterización químicamente de otros pigmentos observados.

## 11. REFERENCIAS

Acuña J. M., García-Gutiérrez, C., Rosas-García, N. M., López-Meyer, M., Saínz-Hernández, J. C. (2015). Formulación de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin con polímeros biodegradables y su virulencia frente a *Heliothis virescens* (Fabricius). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 31(3): 219-226

Alurappa, R., Bojgowda, M. R., Kumar, V., Mallesh, N. K., Chowdappa, S. (2014). Characterization and bioactivity of oosporein produced by endophytic fungus *Cochliobolus kusanoi* isolated from *Nerium oleander* L. *Natural Product Research*. 28(23): 2217-2220. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.924933>.

Amin, G. A., Youssef, N. A., Bazaid, S. Saleh, W. D. (2010). Evaluación de la actividad insecticida del pigmento rojo producido por el hongo *Beauveria bassiana*. *Revista Mundial de Microbiología y Biotecnología*. 26(12): 2263-2268. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0146-5>.

Araujo de Albuquerque Maranhao, E. y de Albuquerque Maranhão, E. H. (2009). Hongos entomopatógenos: Importante herramienta para el control de “moscas blancas” (*Homoptera: Aleyrodidae*). *Anais da Academia Pernambucana de Ciencia Agronómica*. 5: 209-242.

Asaff-Torres, A. (2006). *Producción de metabolitos insecticidas por Paecilomyces fumosoroseus en fermentación líquida y sólida* [Tesis de doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana]. Red Mexicana de Repositorios Institucionales.

Arboleda, J. W., Delgado, F., Valencia, A. (2003). Efecto de la toxina beauvericina sobre *Hypothenemus hampei*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. 68: 71-76.

Ballesteros-Torres, J. M. (2013). *Factores nutricionales que afectan la actividad insecticida de Beauveria bassiana (BALSAMO) Vuillemin contra Periplaneta americana L. y la respuesta inmune del insecto* [Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Nuevo León]. Colección Digital UANL.

Bautista, E. J., Mesa, L., Gómez, A. M. (2018). Alternatives for the production of

microbial biopesticides based on fungi: The case of Latin America and the Caribbean. *Scientia Agropecuaria*. 9(4): 585-604. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.04.15>.

Bettiol, W., Rivera, M. C., Mondino, P., Montealegre, J. R., Colmenarez, Y. (2014). Control biológico de enfermedades de plantas en México. En Bravo-Luna, L. y Guigón-López, C. (Eds.). *Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe* (pp. 265-286). Facultad de Agronomía, Universidad de la República.

Bich, G. A., Castrillo, M. L., Silva, M. R. V., Díaz, G. V., Villalba, L., Zapata, P. D., Medvedeff, M. G. (2015). Hongos entomopatógenos en la provincia de Misiones: Revisión. *Revista de Ciencia y Tecnología*. 17(23): 54-58.

Borges, D., Díaz, A. O., San Juan, A. N., Gómez, E. (2010). Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos. *ICIDCA Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. 44(3): 49-55.

Brakhage, A. A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*. 11(1): 21-32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2916>.

Bycroft, B. W. y Payne, D. J. (2014). *Dictionary of Antibiotics and Related Substances* (2ª ed., pp. 320-340). CRC Press.

Cañedo V., Alfaro A., Kroschel J. (2011). *Manejo integrado de plagas de insectos en hortalizas: Principios y referencias técnicas para la Sierra Central de Perú* (1ª ed., pp.7-47). Centro Internacional de la Papa.

Carrillo-Rayas, M. T. y Blanco-Labra, A. (2009). Potencial y algunos de los mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga. *Acta Universitaria*. 19(2): 40-49.

Carrión-Jara, A. V. (2010). *Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia de metódica* [Tesis de licenciatura, Universidad de Cuenca]. Repositorio Institucional Universidad de Cuenca.

Chaparro-Pedraza, A. P. (2010). *Aislamiento e identificación de metabolitos*

*producidos por la cepa nativa SPG 321 de Mucor circinelloides y evaluación de su actividad microbiana* [Tesis de maestría, Pontificia Universidad Javeriana]. Repositorio Institucional Pontificia Universidad Javeriana.

Cimmino, A., Masi, M., Evidente, M., Superchi, S., Evidente, A. (2015). Fungal phytotoxins with potential herbicidal activity: chemical and biological characterization. *Natural Product Reports*. 32(12): 1629-1653. <https://doi.org/10.1039/C5NP00081E>.

Cole, R. J., Kirksey, J. W., Cutler, H. G., Davis, E. E. (1974). Toxic effects of oosporein from *Chaetomium trilaterale*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 22(3): 517-520. <https://doi.org/10.1021/jf60193a049>.

Cortés-Sánchez, A. D. J. y Mosqueda-Olivares, T. (2013). Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. *Química Viva*. 12(2): 64-90.

Cruz, M. R., Piña-Guzmán, A. B., Yáñez-Fernández, J., Valencia-Del Toro, G., Bautista-Baños, S., Arce, R. V. (2015). *Pycnoporus sanguineus* pigment production on solid media. *Agrociencia*. 49(4): 347-359.

Damas Buenrostro, G. (2012). *Aislamiento y efectividad de Beauveria bassiana villemín para el control biológico de la cucaracha urbana Periplaneta americana* [Tesis de doctorado, Universidad autónoma de Nuevo León]. Colección Digital UANL.

Da Costa Souza, P. N., Grigoletto, T. L. B., de Moraes, L. A. B., Abreu, L. M., Guimarães, L. H. S., Santos, C., Ribeiro, G. L., Cardoso, P. G. (2016). Production and chemical characterization of pigments in filamentous fungi. *Microbiology*. 162(1): 12-22. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000168>.

Divekar, P. V., Haskins, R. H., Vining, L. C. (1959). Oosporein from an *Acremonium* sp. *Canadian Journal of Chemistry*. 37(12): 2097-2099. <https://doi.org/10.1139/v59-308>.

Dos Reis Celestino, J., de Carvalho, L. E., da Paz Lima, M., Lima, A. M., Ogusku, M. M., de Souza, J. V. B. (2014). Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for

pigment production. *Process Biochemistry*. 49(4): 569-575.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.01.018>.

El Basyouni, S. H. y Vining, L. C. (1966). Biosynthesis of oosporein in *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Canadian Journal of Biochemistry*. 44(5): 557-565.  
<https://doi.org/10.1139/o66-067>.

El Basyouni, S. H. Brewer, D., Vining, L. C. (1968). Pigments of the genus *Beauveria*. *Canadian Journal of Botany*. 46(4): 441-448. <https://doi.org/10.1139/b68-067>.

Eyal, J., Mabud, M. A., Fischbein, K. L., Walter, J. F., Osborne, L. S., Landa, Z. (1994). Assessment of *Beauveria bassiana* Nov. EO-1 strain, which produces a red pigment for microbial control. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 44(1): 65-80.

Fan, Y., Liu, X., Keyhani, N. O., Tang, G., Pei, Y., Zhang, W., Tong, S. (2017). Regulatory cascade and biological activity of *Beauveria bassiana* oosporein that limits bacterial growth after host death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 114(9): 1578-1586.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1616543114>.

Feng, P., Shang, Y., Cen, K., Wang, C. (2015). Fungal biosynthesis of the bibenzoquinone oosporein to evade insect immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112(36): 11365-11370.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1503200112>.

Fernández, R. M., Padilla, A. M. B., Vázquez, C. C., Velázquez, V. M. H. (2011). Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la inhibición de oviposición, eclosión y potencial reproductivo en una cepa triple resistente de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). *Entomotropica*. 25(3): 109-115.

Fukuda, T., Arai, M., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Tomoda, H., Omura, S. (2004). New beauvericins, potentiators of antifungal miconazole activity, produced by *Beauveria* sp. FKI-1366. *The Journal of Antibiotics*. 57(2): 110-116.  
<https://doi.org/10.7164/antibiotics.57.110>.

García Hernández, J., Leyva Morales, J. B., Martínez Rodríguez, I. E., Hernández Ochoa, M. I., Aldana Madrid, M. L., Rojas García, A. E., Perrera Ríos, J. H. (2018). Estado actual de la investigación sobre plaguicidas en México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 34: 29-60. <http://dx.doi.org/10.20937/RICA.2018.34.esp01.03>.

García-Carrucini, M. A., Leyva, V. C., de Jensen, C. E. (2017). Isolation of native entomopathogenic fungi with potential for control of the pepper weevil, *Anthonomus eugenii* Cano, in Puerto Rico. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*. 101(1): 91-106. <https://doi.org/10.46429/jaupr.v101i1.14296>.

García-Gutiérrez, C. y González-Maldonado, M. B. (2010). Uso de bioinsecticidas para el control de plagas de hortalizas en comunidades rurales. *Ra Ximhai: Revista Científica de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sostenible*. 6(1): 17-22.

González-Castillo, M., Aguilar, C. N., Rodríguez-Herrera, R. (2012). Control de insectos plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: retos y perspectivas. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 4(8): 42- 55.

Gutiérrez-Ramírez, A., Robles-Bermudez, A., Santillan-Ortega, C., Ortiz-Caton, M., Cambero-Campos, O. J. (2013). Control biológico como herramienta sustentable en el manejo de plagas y su uso en el estado de Nayarit, México. *Revista Bio Ciencias*. 2(3): 102-112.

Hussain, Z., Hussain, N., Hussain, S., Choudhary, M. I. (2020). Seven new metabolites of drostanolone heptanoate by using *Beauveria bassiana*, and *Macrophomina phaseolina* cell suspension cultures. *RSC Advances*. 10(1): 451-460. <https://doi.org/10.1039/C9RA05878H>.

Jackson, M. A., Payne, A. R., Odelson, D. A. (2004). Liquid-culture production of blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus* using portable fermentation equipment. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 31(4): 149-154. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0127-8>.

Jaronski, S. T. (2014). Mass Production of Beneficial Organisms: Invertebrates and Entomopathogens. En J. A Morales-Ramos., M. G. Rojas., D. I. Shapiro-Illa (Eds.). *Mass Production of Entomopathogenic Fungi: State of the Art* (pp. 357-397). Academic Press.

Khan, A. A., Bacha, N., Ahmad, B., Lutfullah, G., Farooq, U., Cox, R. J. (2014). Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 4(11): 859-870. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0230>.

Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M. S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*. 132: 1-41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>.

Liuzzi, V. C., Mirabelli, V., Cimmarusti, M. T., Haidukowski, M., Leslie, J. F., Logrieco, A. F., Mulè, G. (2017). Enniatin and beauvericin biosynthesis in *Fusarium* species: Production profiles and structural determinant prediction. *Toxins*. 9(2): 1-45. <https://doi.org/10.3390/toxins9020045>.

López-Courrau, K., Rivera-Méndez, W., Brenes-Madriz, J., Zúñiga-Vega, C. (2018). Establecimiento de un protocolo para el crecimiento y multiplicación de *Setophoma terrestris* y *Fusarium spp.* provenientes de un cultivo de cebolla (*Allium cepa* L). *Tecnología en Marcha*. 31(4): 37-48. <https://dx.doi.org/10.18845/tm.v31i4.3958>.

López-Sosa, D. (2018). *Evaluación de la virulencia y viabilidad de los conidios de Beauveria bassiana producidos mediante fermentación bifásica utilizando un inductor* [Tesis de licenciatura, Universidad del Papaloapan].

Luo, Z. L. Y., Mousa, J., Bruner, S., Zhang, Y., Pei, Y., Keyhani, N. O. (2015). Bbmsn2 acts as a pH dependent negative regulator of secondary metabolite production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Environmental Microbiology*. 17(4): 1189-1202. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12542>.

Mao, B. Z., Huang, C., Yang, G. M., Chen, Y. Z., Chen, S. Y. (2010). Separation and determination of the bioactivity of oosporein from *Chaetomium cupreum*. *African Journal of Biotechnology*. 9(36): 5955-5961.

Marín-Cruz, V. H., Rodríguez-Navarro, S., Barranco-Florido, J. E., Cibrián-Tovar, D. (2017). Actividad insecticida e insectistática de *Beauveria bassiana* en *Bradysia impatiens* (Diptera: *Sciaridae*). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 23(3): 329-340. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2016.10.053>.

Mata, M. y Barquero, M. (2010). Evaluación de la fermentación sumergida del hongo entomopatógeno "*Beauveria bassiana*" como parte de un proceso de escalamiento y producción de bioplaguicidas. *Boletín Promecafé*. 122: 8-19.

Mc Namara, L., Dolan, S. K., Walsh, J. M., Stephens, J. C., Glare, T. R., Kavanagh, K., Griffin, C. T. (2019). Oosporein, an abundant metabolite in *Beauveria caledonica*, with a feedback induction mechanism and a role in insect virulence. *Fungal Biology*. 123(8): 601-610. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.01.004>.

Méndez-Zavala, A., Contreras-Esquivel, J. C., Lara-Victoriano, F., Rodríguez-Herrera R., Aguilar C. N. (2007). Producción fúngica de un pigmento rojo empleando la cepa xerofílica *Penicillium purpurogenum* GH-2. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 6(3): 267-273.

Merck. (2020). *Metodología SPE de fase inversa*. Recuperado el 20 marzo de 2020 de <https://www.sigmaaldrich.com/analyticalchromatography/samplepreparation/spe/reversedphase-methodology.html>.

Montesinos-Matías, R., Viniegra-González, G., Alatorre-Rosas, R., Loera, O. (2011). Relationship between virulence and enzymatic profiles in the cuticle of *Tenebrio molitor* by 2-deoxy-D-glucose-resistant mutants of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27(9): 2095-2102. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0672-z>.

Mukherjee, G. y Singh, S. K. (2011). Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Process*

*Biochemistry*. 46(1): 188-192. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.006>.

Noticias Organización de las Naciones Unidas. (11 de febrero de 2020). *El año Internacional de la Sanidad Vegetal: la oportunidad de combatir las plagas del cambio climático*. <https://news.un.org/es/story/2020/02/1469441>.

Centro Nacional de Información Biotecnológica. (2020). PubChem. *Beauvericin*. Recuperado el 26 de septiembre de 2020 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Beauvericin>.

Centro Nacional de Información Biotecnológica. (2020). PubChem. *Oosporein*. Recuperado el 2 de junio de 2020 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oosporein>.

Nagaoka, T., Nakata, K., Kouno, K. (2004). Antifungal activity of oosporein from an antagonistic fungus against *Phytophthora infestans*. *Zeitschrift für Naturforschung*. 59(3): 302-304. <https://doi.org/10.1515/znc-2004-3-432>.

Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J. R., Vázquez-Montoya, E. L. (2012). Bioplaguicidas: Una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai: Revista Científica de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sostenible*. 8(3): 17-29.

Núñez-Gaona O. (2009). *Efecto de la actividad de agua y la modificación de la atmósfera gaseosa sobre la producción y calidad de conidios de Beauveria bassiana* [Tesis de doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana]. Colección de Tesis Electrónicas TESIUAMI.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT). (2019). *Plaguicidas Uso*. Recuperado el 26 de mayo de 2020 de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/RP>.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (19 de febrero de 2020). *SEDENA Y FAO trabajan por la recuperación y protección de los "Suelos de conservación" de la Ciudad de México*. Recuperado el 26 de mayo de 2020 de <http://www.fao.org/mexico/noticias/detail-events/en/c/1267195/>.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (12 de octubre de 2009). *La agricultura mundial en la perspectiva del año 2050*. Recuperado el 26 de mayo de 2020 de [http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues\\_papers/Issues\\_papers\\_SP/La\\_agricultura\\_mundial.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/Issues_papers_SP/La_agricultura_mundial.pdf).

Pacheco-Hernández, M. L., Reséndiz-Martínez, F. J., Arriola-Padilla, V. J. (2019). Organismos entomopatógenos como control biológico en los sectores agropecuario y forestal de México: Una revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 10(56): 4-32. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i56.496>.

Patocka, J. (2016). Bioactive metabolites of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*. *Military Medical Science Letters*. 85(2): 80-88.

Quesada-Moraga, E. y Vey, A. (2004). Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycological Research*. 108(4): 441-452. <https://doi.org/10.1017/S0953756204009724>.

Ragavendran, C., Dubey, N. K., Natarajan, D. (2017). *Beauveria bassiana* (*Clavicipitaceae*): a potent fungal agent for controlling mosquito vectors of *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*). *RSC Advances*. 7(7): 3838-3851. <https://doi.org/10.1039/C6RA25859J>.

Ramesha, A., Venkataramana, M., Nirmaladevi, D., Gupta, V. K., Chandranayaka, S., Srinivas, C. (2015). Cytotoxic effects of oosporein isolated from endophytic fungus *Cochliobolus kusanoi*. *Frontiers in Microbiology*. 6: 870. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00870>.

Ramos Delgado, Y. J. (2016). *Identificación de hongos entomopatógenos de Diaphorina citri Kuwayama, en los departamentos del Valle del Cauca y Quindío, Colombia* [Tesis de doctorado, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio Universidad Nacional.

Recio, R., Ocampo-Gómez, G., Morán-Martínez, J., Borja-Aburto, V., López-Cervantes, M., Uribe, M., Cebrián, M. E. (2005). Pesticide exposure alters follicle-stimulating

hormone levels in Mexican agricultural workers. *Environmental Health Perspectives*. 113(9): 1160-1163. <https://doi.org/10.1289/ehp.7374>.

Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G. H., Luangsaard, J. J., Devotto, L., Humber, R. A. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*. 103(5): 1055-1073. <https://doi.org/10.3852/10-302>.

Reverberi, M., Ricelli, A., Zjalic, S., Fabbri, A. A., Fanelli, C. (2010). Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87(3): 899-911. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2657-5>.

Rodríguez-del-Bosque, L. A. y Arredondo-Bernal, H. C. (2007). Introducción, Filosofía y Alcance del Control Biológico. En J. F. Barrera (Ed.). *Teoría y Aplicación del Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico (1ª ed., pp. 1-48). Sociedad Mexicana de Control Biológico.

Rodríguez-Dozal, S., Rodríguez, H. R., Hernández-Ávila, M., Van Oostdam, J., Weber, J. P., Needham, L. L., Trip. L. (2012). Concentraciones persistentes de contaminantes orgánicos en madres primerizas en todo México. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*. 2(1): 60-69. <https://doi.org/10.1038/jes.2011.31>.

Rohlf, M. y Churchill, A. C. (2011). Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. *Fungal Genetics and Biology*. 48(1): 23-34. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.08.008>.

Rosas-Ramos, P. (2018). *Aislamiento y selección de hongos productores de colorantes* [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Agraria La Molina]. Repositorio Institucional UNALM.

Saxena, S. (2014). Microbial metabolites for development of ecofriendly agrochemicals. *Allelopathy Journal*. 33(1): 1-24.

Schapoaloff, M. E., Alves, L. F. A., Fanti, A. L., Alzogaray, R. A., López L., C. C. (2014). Susceptibility of adults of the cerambycid beetle *Hedypathes betulinus* to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and

*Purpureocillium lilacinum*. *Journal of Insect Science*. 14(127): 1-12.  
<https://doi.org/10.1093/jis/14.1.127>.

Shahid, A. A., Rao, A. Q., Bakhsh, A., Husnain, T. (2012). Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. *Archives of Biological Sciences*. 64(1): 21-42. <https://doi.org/10.2298/ABS1201021S>.

Shin, C. G., An, D. G., Song, H. H., Lee, C. (2009). Beauvericin and enniatins H, I and MK1688 are new potent inhibitors of human immunodeficiency virus type-1 integrase. *The Journal of Antibiotics*. 62(12): 687-690.  
<https://doi.org/10.1038/ja.2009.102>.

Shin, C. S., Kim, H. J., Kim, M. J., Ju, J. Y. (1998). Morphological change and enhanced pigment production of *Monascus* when cocultured with *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology and Bioengineering*. 59(5): 576-581.  
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0290\(19980905\)59:5<576::aid-bit7>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(19980905)59:5<576::aid-bit7>3.0.co;2-7).

Strasser, H., Abendstein, D., Stuppner, H. (2000a). Monitoring the distribution of secondary metabolites produced by the entomogenous fungus *Beauveria brongniartii* with particular reference to oosporein. *Mycological Research*. 104(10): 1227-1233.  
<https://doi.org/10.1017/S0953756200002963>.

Strasser, H., Vey, A., Butt, T. M. (2000b). Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species?. *Biocontrol Science and Technology*. 10(6):717-735.  
<https://doi.org/10.1080/09583150020011690>.

Subramaniyam, R. y Vimala, R. (2012). Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: A comparative study. *International Journal of Science and Nature*. 3(3): 480-486.

Téllez-Jurado, A., Cruz Ramírez, M. G., Mercado Flores, Y., Asaff Torres, A., Arana-Cuenca, A. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología*. 30: 73-80.

- Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Raja, S. S., Vijayakumar R. (2018). An Introductory Chapter: Secondary Metabolites. En R. Vijakumar y S. S. Raja (Eds.). *Secondary Metabolites: Sources Applications* (pp. 1-34). IntechOpen.
- Urbaniak, M., Stepień, L., Uhlig, S. (2019). Evidence for Naturally Produced Beauvericins Containing N-Methyl-Tyrosine in *Hypocreales* Fungi. *Toxins*. 11(3): 1-11. <https://doi.org/10.3390/toxins11030182>.
- Van Lenteren, J. C. (2012). The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. *BioControl*. 57(1): 1-20. <https://doi.org/10.1007/s10526-011-9395-1>.
- Van Driesche, R., Hoddle, M., Center T. (2009). *Control of Pests and Weeds by Natural Enemies: An introduction to biological control* (1ª ed., pp. 4-25). John Wiley and Sons.
- Vega, F. E., Jackson, M.A., Mercadier, G., Poprawski, T. J. (2003). El impacto de la nutrición en la producción de esporas para varios entomopatógenos fúngicos en cultivo líquido. *Revista Mundial de Microbiología y Biotecnología*. 19: 363-368. <https://doi.org/10.1023/A:1023924304456>.
- Vianna, M. F. (2019). *Capacidad biocida de hongos entomopatógenos para el control de plagas del tabaco (Nicotiana tabacum L.) en la provincia de Jujuy, República Argentina* [Tesis de doctorado, Universidad Nacional de La Plata]. Repositorio Institucional de la UNLP.
- Villegas-Mendoza, J. M., Mireles-Martínez, M., Rodríguez-Castillejos, G., Santiago-Adame, R., Rosas-García, N. M. (2019). Evaluación de la Toxicidad de un Extracto Metanólico de *Beauveria bassiana* en Larvas de *Spodoptera exigua* y *Spodoptera frugiperda*. *Southwestern Entomologist*. 44(3): 715-722. <https://doi.org/10.3958/059.044.0316>.
- Wang, C., Skrobek, A., Butt, T. M. (2004). Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 85(3): 168-174. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.02.008>.

Wang, Q. y Xu, L. (2012). Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. *Molecules*. 17(3): 2367-2377.  
<https://doi.org/10.3390/molecules17032367>.

Yilmaz, E., Nivhede, D., Billing, J., Rudolfsson, M., Leeman, M., Senior, A. (2016). Material for and method of extracting mycotoxins. U.S. Patent No. 10,112,177. Washington, DC. *Patent and Trademark Office*.

Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science Technology*. 17(6): 554-596.  
<https://doi.org/10.1080/09583150701309006>.

## 12. TRABAJOS PRESENTADOS

López-Luévano, Keyla Ninive., Martínez-Galero, N. X., Núñez-Gaona, O., García-Gómez, M. J. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD HIDROLÍTICA DE CUATRO CEPAS FÚNGICAS. (cartel) VI Encuentro sobre Biotecnología en la UATx. Tlaxcala, México. Diciembre 2019.



### 13. ANEXO

Medios de cultivo empleados.

| Medio de cultivo              | Ingredientes   | Preparación  |
|-------------------------------|--|--|
| Caldo Dextrosa Sabouraud      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Peptona (BIOXON, México)</li> <li>• Dextrosa (Golden Bell, México)</li> <li>• Extracto de levadura (BIOXON, México).</li> </ul>   | Se agregaron 10 g/L de peptona, 40 g/L de dextrosa y 0.05 g/L de extracto de levadura y se disolvieron en agua destilada estéril.  |
| Caldo Papa Dextrosa           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Papa dextrosa (Difco Dickinson, México).</li> </ul>   | Se agregaron únicamente 24 g/L de medio papa dextrosa en agua destilada estéril.   |
| Caldo Papa Dextrosa Artesanal | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Papa</li> <li>• Dextrosa (México)</li> </ul>  | Se pesaron 200 g de papa y 30 g/L de dextrosa, posteriormente se hirvieron en 1 L de agua destilada estéril durante 20 min, finalmente se recuperó la infusión.  |
| Caldo Czapek-dox              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dextrosa (Golden Bell, México)</li> <li>• Nitrato de sodio (Sigma Aldrich, USA)</li> <li>• Fosfato de potasio dibásico (Vetec Química fina, Brasil)</li> <li>• Sulfato de magnesio (J.T. Baker, Japón)</li> <li>• Sulfato ferroso (Sigma Aldrich, India)</li> <li>• Cloruro de potasio (Vetec Química fina, Brasil).</li> </ul> | Se pesaron 30 g/L de dextrosa, 3 g/L de nitrato de sodio, 1 g/L fosfato de potasio dibásico, 0.5 g/L sulfato de magnesio, 0.01 g/L sulfato ferroso, 0.5 g/L cloruro de potasio y se disolvieron en agua destilada estéril. |